

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА И ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ G-CSF У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Нестерова И.В.², Ковалёва С.В.¹, Евглевский А.А.¹, Чудилова Г.А.¹, Ломтатидзе Л.В.¹, Фомичева Е.В.¹

¹Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Россия

²Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

В эксперименте *in vitro* изучена корреляционная связь экспрессии мембранных рецепторов CD16, CD32 и CD11b нейтрофильных гранулоцитов (НГ) больных колоректальным раком (КРР) и уровня реструктуризации их хроматина в условиях стимуляции клеток G-CSF. Показано, что G-CSF обладает значительным нормализующим (модулирующим) эффектом в отношении уровня реструктуризации хроматина НГ больных КРР и ее корреляционных отношений с экспрессией рецепторов CD16, CD32. В тоже время, при сохранении положительного модулирующего эффекта относительно уровня реструктуризации хроматина НГ G-CSF усугубляет характер корреляционных отношений этого показателя в отношении экспрессии рецептора CD11b.

Ключевые слова: реструктуризация хроматина, фенотип, нейтрофильные гранулоциты, колоректальный рак.

REMODELING OF CHROMATIN STRUCTURE AND CHANGE THE PHENOTYPE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES INFLUENCED G-CSF IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Nesterova I.V.², Kovaleva S.V.¹, Evglevskiy A.A.¹, Chudilova G.A.¹, Lomtatidze L.V.¹, Fomicheva E.V.¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

The experiment studied *in vitro* correlation of expression of membrane receptors CD16, CD32 and CD11b neutrophil granulocytes (NG) in patients with colorectal cancer (CRC) and the level of restructuring their chromatin under cell stimulation G-CSF. It is shown that G-CSF has a significant normalizing (modulating) the effect on the level of chromatin restructuring NG patients with CRC and its correlation with the expression of receptors relations CD16, CD32. At the same time, while maintaining a positive modulating effect on the level of chromatin restructuring NG G-CSF exacerbates the nature of the correlations of this parameter with respect to receptor expression CD11b.

Keywords: restructuring chromatin, phenotype, neutrophilic granulocytes, colorectal cancer.

В настоящее время нейтрофильные гранулоциты (НГ) признаны антигенпрезентирующими клетками, способными к дифференцировке и активации ядра – реструктуризации хроматина, экспрессии многочисленных генов, синтезу и секреции цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и различных пептидов [1,6,7].

Представляется важным, что выяснение связи между структурой и функцией хроматина НГ, его способности к реструктуризации при неопластических процессах, в частности при колоректальном раке (КРР), является весьма актуальной задачей. При этом следует подчеркнуть, что уточнение изменений активности хроматина в сопоставлении с особенностями ремоделирования их рецепторного репертуара при этой патологии до настоящего времени не проводилось [1, 2, 3].

Цель исследования: уточнение корреляционных взаимосвязей (КС) между нормальной и дефектной способностью хроматина НГ к реструктуризации и особенностями трансформации фенотипа НГ под влиянием G-CSF у здоровых субъектов и пациентов с КРР в системе *in vitro*.

Материалы и методы

В группу исследования вошли 10 пациентов обоего пола в возрасте от 38 до 70 лет с впервые выявленным КРР II–III стадии развития неопластического процесса непосредственно перед хирургическим вмешательством. Контрольную группу, сопоставимую по полу и возрасту, составили 10 условно здоровых добровольцев.

Методом проточной цитометрии на CYTOMICS FC500 (Beckman Coulter, США) с панелью моноклональных антител, меченных различными флуорохромами CD32, CD16, CD11b (Beckman Coulter, США), определялась экспрессия данных поверхностных мембранных маркеров на НГ периферической крови. Оценивался уровень плотности экспрессируемых молекул на НГ по показателю интенсивности флуоресценции (MFI). Оценка реструктуризации хроматина ядер НГ по уровню оптической анизотропии (ОА) хроматина ядер НГ проводилась с использованием модифицированного метода Нестеровой и соавт. [4]. Изучение функциональных свойств НГ в нагрузочных тестах *in vitro* проводилось после инкубации с G-CSF в течение 60 минут. При этом исследовались фенотипические изменения НГ (CD16, CD32, CD11b) и особенности реструктуризации хроматина ядер НГ. Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов вариационной статистики. Методом корреляционного анализа с использованием компьютерной программы Biostat 4.0. проанализирована КС уровня ОА и уровня экспрессии рецепторов CD16, CD32, CD11b НГ. Отличие от контрольных значений во всех случаях было статистически значимо (уровень значимости не ниже $p < 0,05$).

Цель исследования: уточнение связи между нормальной и дефектной способностью хроматина НГ к ремоделированию, ассоциированному с трансформацией фенотипа НГ под влиянием G-CSF у больных КРР в системе *in vitro*.

Обсуждение полученных результатов

У клинически здоровых лиц контрольной группы морфологически зрелые НГ обнаруживают прямую корреляционную связь между экспрессией низкоаффинного рецептора CD16 и величиной оптической анизотропии их хроматина, как в спонтанном тесте, так и при экспериментальном воздействии с помощью G-CSF, то есть с увеличением уровня оптической анизотропии увеличивается и экспрессия данного рецептора. Величина оптической анизотропии, в определенной степени, характеризует степень зрелости НГ. Ее возрастание свидетельствует о большей конденсации хроматина НГ, а значит, о большей его

зрелости и функциональной состоятельности. Следует отметить, что в спонтанном тесте уровень прямой корреляционной связи был достаточно низким (0,28), а воздействие G-CSF практически приводит к ее полному исчезновению ($R = 0,14$), при этом и уровень реструктуризации хроматина, а также экспрессия рецептора умеренно снизилась по отношению к контролю (рис. 1С). Как было показано ранее, уровень реструктуризации хроматина, выражающийся в уровне его оптической анизотропии, свидетельствует не только о зрелости НГ, но и о его функциональной активации. Таким образом, наличие прямой корреляционной связи между уровнем оптической анизотропии хроматина морфологически зрелых НГ и экспрессией рецептора CD16 свидетельствует о том, что клетки с пониженной функциональной активностью обладают более высокой экспрессией данного рецептора. Видимо, экспрессия рецептора CD16 равномерно нарастает по мере созревания НГ и отражает стадии его подготовки к апоптозу, что и отражается на характере корреляционных отношений между уровнем экспрессии рецептора и уровнем активации НГ. В свете данной интерпретации полученных результатов следует предположить, что действие G-CSF, видимо, сводится к снижению «возрастного» разнообразия НГ внутри популяции морфологически зрелых клеток, а чрезмерное искусственное их «старение» приводит к уменьшению уровня экспрессии рецептора CD16.

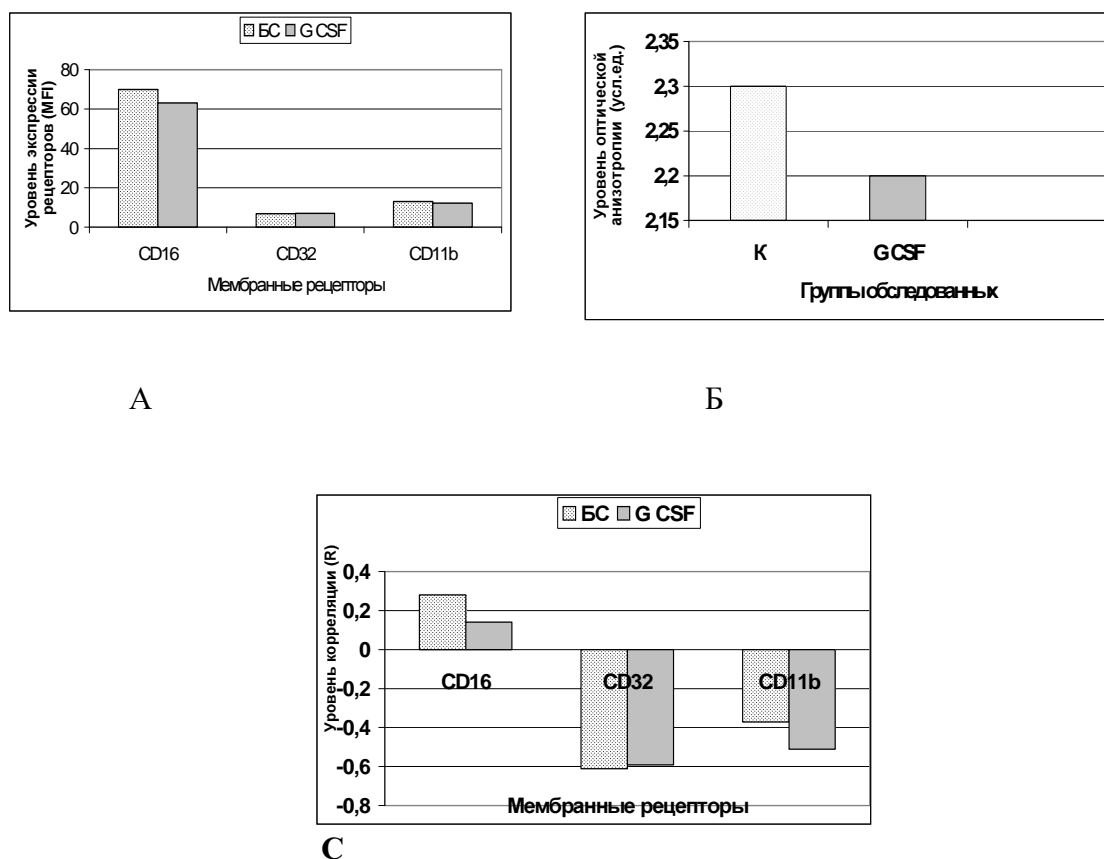


Рис. 1. Уровни экспрессии (А), уровни оптической анизотропии (Б) и корреляционные связи (С) экспрессии рецепторов CD16, CD32, CD11b и уровня оптической анизотропии хроматина нейтрофильных гранулоцитов здоровых людей в условиях влияния G-CSF

Характер корреляционных связей уровня оптической анизотропии хроматина морфологически зрелых НГ и экспрессии рецептора CD32, имеющего умеренный уровень аффинности и отвечающего аналогично рецептору CD16 за цитотоксическую функцию НГ, существенно отличался от описанного выше (рис. 1). При этом следует отметить, что корреляционные связи между экспрессией самих рецепторов CD16 и CD32 также носят выраженный обратный характер ($R=-0,76$). Анализ результатов исследования показал, что уровень корреляционной связи между величиной оптической анизотропии хроматина НГ в спонтанном тесте и экспрессией рецептора CD32 составил 0,61, то есть носил сильный обратный характер. Таким образом, морфологически зрелые НГ, обладающие меньшим уровнем анизотропии (реструктуризации) хроматина, имели более высокую экспрессию рецептора CD32. Применение стимулятора G-CSF не изменило знака корреляционной связи, но снизило ее уровень до умеренного ($R=-0,59$) (рис.1).

Анализ корреляционных связей между уровнем анизотропии хроматина морфологически зрелых НГ и экспрессией рецептора CD11b показал, что в спонтанном тесте

она умеренная и обратная ($R=-0,37$). Следовательно, клетки, имеющие меньший уровень анизотропии (большая реструктуризация хроматина), обладали более выраженной экспрессией исследованного рецептора. Применение стимулятора G-CSF увеличило обратный уровень корреляционной связи до $-0,51$ (рис.1).

Таким образом, в спонтанном тесте корреляционная связь экспрессии рецепторов CD32 и CD11b с уровнем оптической анизотропии имеет выраженный обратный характер, то есть клетки с низким уровнем оптической анизотропии, а значит, биологически более активные, характеризуется высокой экспрессией рецепторов. Корреляция экспрессии рецептора CD16 с уровнем оптической анизотропии хроматина, напротив, характеризуется прямой направленностью, что, вероятно, связано с постепенным нарастанием уровня экспрессии данного рецептора по мере созревания НГ. Реструктуризация хроматина НГ также весьма умеренная (рис. 1).

У больных КРР анализ корреляционных связей экспрессии рецептора CD16 и уровня оптической анизотропии хроматина НГ показал, что в отличие от здоровых людей контрольной группы эта связь носит обратный характер ($R-0,34$). Таким образом, НГ, обладающие более высоким уровнем анизотропии (слабая реструктуризация хроматина), характеризуются сниженной экспрессией рецептора CD16. Можно предположить, что популяция НГ у больных КРР более однородна, чем у здоровых людей, ввиду более низкого темпа обновления. В этих условиях НГ с более низким уровнем оптической анизотропии хроматина, а значит, биологически более активные, будут иметь более высокий уровень экспрессии рецептора CD16. Следует учитывать, что исследования проводились в опыте *in vitro* и, следовательно, изучался определенный «временной срез» популяции морфологически зрелых НГ.

Характер корреляционных связей экспрессии рецепторов CD32 и CD11b и уровня оптической анизотропии хроматина у больных КРР также имел существенные отличия от аналогичных показателей, характерных для здоровых лиц (рис. 2). В отличие от здоровых лиц в обоих случаях наблюдалась прямая корреляционная связь, причем, если для рецептора CD32 ее уровень был пренебрежительно мал (полное отсутствии какой-либо корреляции), то для рецептора CD11b ее уровень был умеренным. Следует заметить, что сама по себе смена знака корреляционной связи также является весьма важной.

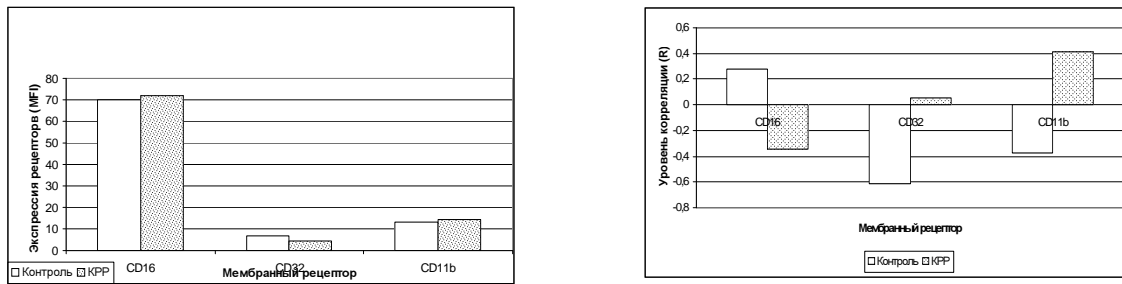


Рис. 2. Уровень экспрессии (А) и корреляционные связи (Б) экспрессии рецепторов CD16, CD32, CD11b нейтрофильных гранулоцитов здоровых людей и больных колоректальным раком

Подобные результаты, также как и в случае с рецептором CD16, объясняются большей однородностью популяции НГ больных КРР, когда ведущим фактором для определения характера корреляционных связей между экспрессией рецептора становится не степень активации НГ, а степень его функциональной полноценности. Подобная точка зрения находит подтверждение в результатах исследования уровня оптической анизотропии хроматина НГ здоровых людей и больных КРР, проведенных ранее. При этом было установлено, что у здоровых лиц контрольной группы средний уровень оптической анизотропии хроматина был равен $2,3 \pm 0,06$ при коэффициенте вариации (CV) 10 %, а у больных КРР $2,66 \pm 0,07$ при коэффициенте вариации 7 %.

В условиях эксперимента (рис. 3) анализ особенностей корреляционных связей экспрессии рецепторов CD16, CD32 и CD11b и уровня оптической анизотропии хроматина НГ больных КРР показал, что при стимуляции НГ G-CSF корреляция экспрессии рецептора CD16 с исходным уровнем оптической анизотропии хроматина была умеренной обратной, а при использовании в качестве парного значения для проведения корреляционного анализа уровня оптической анизотропии хроматина после стимулирующего воздействия – умеренной прямой (соответственно, $R = -0,36$ и $R = +0,33$). Таким образом, применение G-CSF не только способствовало восстановлению уровня оптической анизотропии хроматина, характерного для здоровых лиц, но и нормализовало корреляционные отношения исследуемых показателей.

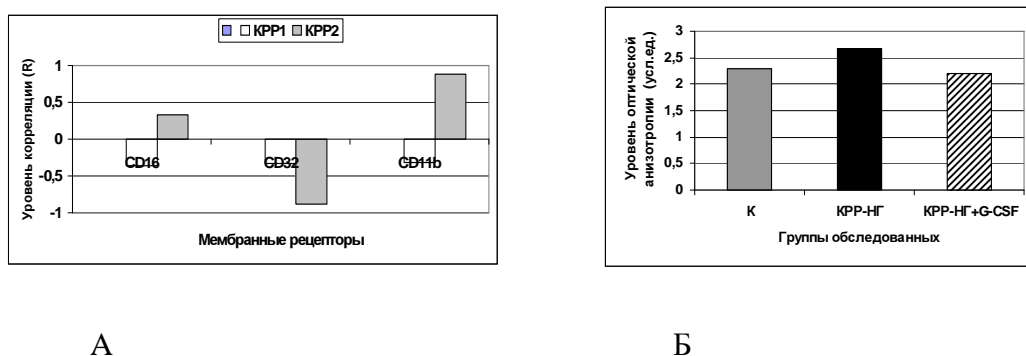
Таким образом, можно констатировать, что G-CSF является полноценным нормализующим агентом в отношении уровня оптической анизотропии (реструктуризации) хроматина НГ и характера ее корреляционных связей с экспрессией рецептора CD16.

При воздействии на взвесь НГ G-CSF корреляция экспрессии рецептора CD32 с исходным уровнем оптической анизотропии хроматина была умеренной обратной, а при использовании в качестве парного значения уровня оптической анизотропии хроматина после стимулирующего воздействия она возросла до сильной (соответственно, $R = -0,33$ и $R =$

–0,85). Таким образом, как и в отношении рецептора CD16 применение G-CSF не только способствовало восстановлению уровня оптической анизотропии хроматина, характерного для здоровых лиц, но и нормализовало корреляционные отношения исследуемых показателей.

При стимуляции НГ G-CSF корреляция экспрессии рецептора CD11b с исходным уровнем оптической анизотропии хроматина была умеренной обратной, а при использовании в качестве парного значения уровня оптической анизотропии хроматина после стимулирующего воздействия она изменилась до сильной прямой (соответственно, $R = -0,32$ и $R = +0,88$). Из чего следует, что применение G-CSF способствовало восстановлению уровня оптической анизотропии хроматина, характерного для здоровых лиц, но усугубляло корреляционные отношения исследуемых показателей, характерные для больных КРР.

В целом G-CSF обладает значительным нормализующим (модулирующим) эффектом в отношении уровня оптической анизотропии (реструктуризации) хроматина НГ больных КРР и ее корреляционных отношений с экспрессией рецепторов CD16, CD32, однако при сохранении положительного модулирующего эффекта относительно уровня реструктуризации хроматина НГ усугубляет характер корреляционных отношений этого показателя в отношении экспрессии рецептора CD11b.



А

Б

Рис. 3. Корреляционные связи экспрессии рецепторов CD16, CD32, CD11b и уровня оптической анизотропии хроматина нейтрофильных гранулоцитов у больных колоректальным раком в условиях воздействия G-CSF (А. Корреляционные отношения экспрессии рецептора CD16, CD32, CD11b на НГ при КРР; КРР1-корреляционные отношения экспрессии рецепторов с исходным уровнем анизотропии; КРР2 – корреляционные отношения экспрессии рецепторов с уровнем анизотропии после воздействия G-CSF. Б. Уровень оптической анизотропии хроматина НГ при КРР (К – НГ здоровых лиц; КРР-НГ – НГ больных КРР без воздействия G-CSF; КРР-НГ+G-CSF - НГ больных КРР после воздействия G-CSF).

Список литературы

1. Нестерова И.В. Нейтрофильные гранулоциты – ключевые клетки иммунной системы / Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А., Фомичёва Е.В., Быковская Е.Ю.,

Рожкова Г.Г., Капранова Н.П., Ковалёва С.В. // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т 9. – № 4. – С. 432-435.

2. Нестерова И. В. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислородзависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке / Нестерова И. В., Евглевский А. А., Фомичева Е. В., Колесникова Н. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Коков Е. А., Кокова Л. Н. // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5, № 3/4. – С. 254-261; С. 260-261.

3. Нестерова И. В. Особенности ремоделирования фенотипа и функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком под влиянием G-CSF в системе *in vitro* / Нестерова И. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Евглевский А. А., Колесникова Н. В., Фомичева Е.В., Коков Е.А. // Иммунология. – 2012. – Т. 33, № 6. – С. 306-311; С. 310-311.

4. Нестерова. И.В. Особенности активационного потенциала ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии./ Евглевский А.А., Фомичева Е.В. // Цитокины и воспаление. – 2004. – 3(2). – С. 52-55.

6.Hamon V.F. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections / Hamon V.F., Cossart P. // Cell Host Microbe 2008, 4(2), 100-109.

7.Zhang X., - Gene expiession in mature neutrophils:early responses to inflammatory stimuli / Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y. et. al / J. Leukoc.Biol 2004, 75(2), 358-372.

Рецензенты:

Абушкевич В.Г., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.

Алексянц Г.Д., д.м.н., профессор, проректор по научно-исследовательской работе ФГБОУ ВПО КГУФКСТ, г. Краснодар.