

Название проекта: Перепрограммирование трансформированных фенотипа, реструктуризации хроматина и экспрессии генов дефектно функционирующих нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте.

Основная информация по проекту

Научная платформа: иммунология

Количество исполнителей: 9

Из них до 35 лет: 3

Из них обучающихся: 2

Суммарное количество публикаций по теме: 61

Из них в зарубежных изданиях: 14

Год начала: 2015

Год окончания: 2017

Стадия развития проекта: Научно-исследовательская работа

Объем финансирования на период реализации (руб): свыше 3000000

Объем финансирования на календарный год (руб): 2000000

Объем предполагаемого софинансирования (руб): 1500000

Краткая аннотация (1500 знаков)

Убедительно показано, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) обладают большим комплексом возможностей и способны выполнять широкий объем специализированных функций. Дефекты функционирования НГ отягощают течение различных воспалительных заболеваний и могут приводить к летальному исходу (нейтропеническая форма сепсиса). Описаны дисфункции НГ, которые могут протекать по разному сценарию и манифестировать как гипофункцией на фоне дефицита НГ при рецидивирующих гнойных процессах, хронических заболеваниях различной этиологии, не поддающихся стандартному лечению, так и блокадой функциональной активности: развитием неадекватного ответа, вплоть до состояния неотвечаемости при хронических вялотекущих воспалительных процессах, или гиперэргичеким функционированием с повреждением органов и тканей при хронических иммунозависимых заболеваниях или септическом шоке. Настоящий проект направлен на решение фундаментальной научной проблемы, связанной с уточнением особенностей дефектного функционирования НГ (спонтанной и индуцированной реструктуризация ядерного хроматина, фенотипа различных субпопуляций НГ и их функциональной активности, экспрессии генов цитокинов), что дает новые знания о молекулярно-клеточных механизмах при вирусных, бактериальных и вирусно-бактериальных процессах. На основе полученных сведений будут разработаны варианты моделей перепрограммирования дефектно функционирующих НГ в системе *in vitro* посредством цитокиновой и пептидной регуляции.

Соответствие проекта тематике заявленной научной платформы

Проект направлен на решение фундаментальной научной проблемы, связанной с уточнением особенностей дефектного функционирования НГ (спонтанной и индуцированной реструктуризация ядерного хроматина, фенотипа различных субпопуляций НГ и их функциональной активности, экспрессии генов цитокинов), что дает новые знания о молекулярно-клеточных механизмах при вирусных, бактериальных и вирусно-бактериальных процессах, и созданием новых современных подходов к регуляции нарушенных функций НГ. На основе полученных сведений будут разработаны варианты моделей перепрограммирования дефектно функционирующих НГ в системе *in vitro*

in vitro посредством цитокиновой и пептидной регуляции. Проект полностью соответствует тематике научной платформы «Иммунология».

Актуальность исследования:

В свете современных представлений нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются уникальной мультипотентной популяцией клеток иммунной системы (ИС), относящейся к врожденному иммунитету, но обладающей важными функциональными возможностями, позволяющими активировать и регулировать адаптивный иммунитет, способствуя его полноценной реализации (Нестерова И.В. и соавт., 2008; Mantovani A. et al, 2011). Воспалительные процессы, характеризующиеся упорным рецидивированием или генерализацией воспалительного процесса с развитием септических осложнений, протекающие на фоне расстройств ИС, и в частности, на фоне дисфункций НГ, в нашей стране приводят к повышенной заболеваемости, частичной, а иногда и полной потере трудоспособности, высокой летальности при сепсисе как у детей, особенно в периоде новорожденности, так и у взрослых субъектов Колесникова Н.В. и соавт, 2009-2013; Нестерова и соавт, 2000-2013 ; Караулов А.В., 2010-2013; Маркова Т. П. И соавт., 2010-2012г.г., Маркова Т.П., 2014; Хаитов Р. М. и соавт., 2009-2013).

В настоящее время описаны дисфункции НГ, которые при различных воспалительных процессах могут протекать по разным сценариям и манифестировать как гиподисфункцией на фоне дефицита НГ при рецидивирующих и упорно-рецидивирующих гнойных процессах, хронических заболеваниях вирусно-бактериальной этиологии, не поддающихся стандартному лечению, так и блокадой функциональной активности: развитием неадекватного ответа вплоть до состояния неотвечаемости при хронических вялотекущих инфекционно-воспалительных процессах с затяжным течением обострений, социально-значимых инфекциях, при сепсисе, или гиперэргическим функционированием (например - внеклеточная продукция кислородных радикалов в высокой концентрации), которое может приводить к супрессии Т-клеточного иммунитета, повреждению органов и тканей при хронических иммунозависимых заболеваниях или септическом шоке (Van Bruggen R., Drewniak A. et al, 2010; De Oliveira-Junior E. B., Bustamante J. et al ,2012; Klebanoff S.J., Kettle A.J. et al, 2013; Winterbourn C.C., Kettle A.J. 2013).

Сегодня убедительно показано, что НГ реально обладают большим комплексом возможностей и способны выполнять широкий объем специализированных функций. При изучении особенностей фенотипа НГ и их функциональных свойств продемонстрировано существование несколько субпопуляций НГ, обладающих различными возможностями. НГ, получающие комплексные цитокиновые влияния во время развития воспалительного ответа, не только приобретают новые черты, но и проходят различные стадии активации и дифференцировки, экспрессируя при этом АГ II класса ГКГС, CD80, CD86, ICAM-1, LFA-1 (Galligan, Yoshimura, 2003, Нестерова И.В., соавт. 2010-2012). Под влиянием разнообразных индуцирующих стимулов (микробные АГ, G-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN γ , TNF) НГ секретирует большой спектр про- и противовоспалительных цитокинов, иммунорегуляторных цитокинов, колониестимулирующих факторов ангиогенных и фиброгенных факторов, СХС- и СС-хемокинов, различных регуляторных белков и т.д. (Mantovani A. et al, 2011). Мощный гранулярный аппарат НГ (азурофильные, специфические, желатиновые гранулы и везикулы) участвует в процессах внутриклеточной интрафагосомальной дегрануляции. Действие продуцируемых ими мощных кислородных радикалов направлено на осуществление киллинга и элиминацию фагоцитированных микроорганизмов. При внеклеточной дегрануляции происходит формирование нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (ловушек), и продукты гранул (миелопероксидаза, протеазы, дефенсины и т.д.), "залипая" в сетях ядерной /или митохондриальной ДНК, выстрелившей из НГ, осуществляют внеклеточный киллинг

микроорганизмов (Nathan C., 2006; Bazzoni, F. et al, 2009; Cassatella M. A. 2009; Kobayashi S. D., De Leo F.R., 2009; Borregaard N., 2010; Soehnlein O., Lindbom L. 2010; Beauvillain, C. et al, 2011).

Убедительно доказано, что НГ могут повышать экспрессию генов, вовлекаемых в реализацию фагоцитарной функции, а также отвечать на воздействие провоспалительных цитокинов (TNF α , G-CSF, INF γ) дифференцировкой, выражающейся экспрессией рецепторов, присущих антигенпрезентирующим клеткам (АПК). Они могут становиться участниками формирования цитокиновой сети посредством секреции провоспалительных (IL-1 α , IL-1 β , CSF, INF γ , TNF α и т.д.) и противовоспалительных (IL-4, IL-10, IL-1 β Ra и т.д.) цитокинов, регулируя при этом экспрессию генов. Таким образом, в настоящее время НГ признан АПК, способной к дифференцировке и активации ядра – реструктуризации хроматина, экспрессии многочисленных генов, синтезу и секреции цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, различных пептидов и ряда других молекул, в том числе участвующих в формировании экстрацеллюлярных нейтрофильных сетей. Имеются многочисленные данные, демонстрирующие сопряженность активной реструктуризации ядер хроматина НГ с экспрессией многочисленных генов (Smale S.T. 2002; Zhang X., 2004; Li B, 2007. Hamon V.F., 2008, Brinkmann V., Zychlinsky A., 2012).

Физиологические функции НГ играют важную роль в иммунном ответе, не только из-за их участия в ранней фазе острого воспаления, но также из-за поддержания прогрессии воспалительной реакции и следующей за ней инициации специфического иммунного ответа посредством продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов. Эти факты подчеркивают важную роль, физиологическое и патофизиологическое значение НГ в патогенезе воспалительных, инфекционных, аутоиммунных и неопластических заболеваний, идентифицируя НГ, как важнейшую потенциальную цель для селективной фармакологической интервенции, которая может действовать в двух направлениях: промотировать или ограничивать воспаление. В этом контексте, понимание механизмов модуляции НГ цитокинами или хемокинами и другими регуляторными пептидами представляет критичные шаги к пониманию того, как НГ могут влиять на патофизиологические процессы *in vivo* (Tamassia N.I., Cassatella M. A., Bazzoni F., 2014).

В связи с изложенным насущной задачей фундаментальной иммунологии является изучение различных вариантов дисфункций НГ с уточнением особенностей спонтанной и индуцированной реструктуризации ядерного хроматина, экспрессии генов цитокинов, трансформации фенотипа различных субпопуляций и функциональной активности НГ, и, на этой основе, поиск методов, направленных на улучшение функционирования дефектных НГ. Разработка экспериментальных подходов к созданию методов ремоделирования различных вариантов дефектно функционирующих НГ при различных воспалительных процессах в настоящее время является актуальнейшей проблемой и требует своевременного решения. До настоящего времени подобного комплексного исследования не проводилось ни в России, ни за рубежом.

Идея настоящего проекта состоит в создании нескольких вариантов перепрограммирования дефектно функционирующих НГ с поврежденной фагоцитарной функцией, экспрессией рецепторов, нарушением реструктуризации хроматина, экспрессии генов.

Общий план научно-исследовательской работы:

1 этап -2015г.

Уточнить варианты дефектного функционирования НГ при вирусных, бактериальных и вирусно-бактериальных патологических процессах. Разработка диагностической модели (спонтанная и индуцированная реструктуризация ядерного хроматина, фенотип различных субпопуляций НГ и их функциональная активность, экспрессия генов цитокинов)

2 этап-2016г.

Разработка и создание экспериментальной модели для перепрограммирования дефектно функционирующих НГ (спонтанная и индуцированная реструктуризация ядерного хроматина, фенотип различных субпопуляций НГ и их функциональная активность, экспрессия генов цитокинов) под влиянием пептидных регуляторов.

3 этап-2017г.

Разработка и создание экспериментальной модели для перепрограммирования дефектно функционирующих НГ (спонтанная и индуцированная реструктуризация ядерного хроматина, фенотип различных субпопуляций НГ и их функциональная активность, экспрессия генов цитокинов) под влиянием цитокинов. Уточнить варианты ответа дефектно функционирующих НГ на цитокиновое и пептидное перепрограммирование.

Результаты исследований будут представлены в серии статей в российских и зарубежных изданиях, разработаны методические рекомендации, подготовлены материалы к патентованию.

Научный коллектив:

Руководитель: Нестерова Ирина Вадимовна, дмн, профессор, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель: Тараканов Виктор Александрович, дмн, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель: Ковалева Светлана Валентиновна, кмн, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории и ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель: Ломтатидзе Людмила Викторовна, кбн, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории и ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель: Чудилова Галина Анатольевна, кбн, заведующая отделом Центральной научно-исследовательской лаборатории и доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель (до 35 лет): Коков Евгений Александрович, кмн, младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории и доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель: Евглевский Андрей Александрович, кбн, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории и доцент кафедры гистологии с эмбриологией ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель (до 35 лет): Дыдышко Екатерина Игоревна, ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Исполнитель (до 35 лет): Русинова Татьяна Викторовна, аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторного дела ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России

Финансовая модель. Для выполнения поставленных задач и проведения исследований на современном уровне планируется приобрести: 1. Центрифуга холодовая – 350000 руб. 2. CO₂ инкубатор – 100000 руб. 3. Магнитный сортер для выделения клеток – 540000руб. 4. Хемилуминометр – 500000 руб. 5. Наборы моноклональных антител BECTAN COULTER для проточной цитометрии – 200 000 руб. 6. Расходные материалы для проточной цитометрии (лизирующие растворы, контрольные материалы, промывочный раствор, обжимающая жидкость, пробирки, наконечники) - всего 100000 руб. 7. Наборы для цитохимических исследований – 50000 руб. 8. Реактивы для ПЦР-диагностики уровня генной экспрессии – 150000 руб. 9. Вещества для нагрузочных тестов in vitro – 10000 руб. Планируется использование приобретенного оборудования и материалов Центральной научно-исследовательской лабораторией, которая является основной базой центра коллективного пользования оборудованием (руководитель Колесникова Н.В.):

Конкурентные преимущества проекта.

В настоящее время в России только наш научный коллектив занимается изучением нейтрофильных гранулоцитов с комплексной всесторонней оценкой их функционирования. Подобные комплексные подходы, позволяющие оценить фенотип НГ, их функциональную и микробицидную активность, способность к реструктуризации хроматина, экспрессии генов цитокинов являются конкурентоспособными и приоритетными как в нашей стране, так и за рубежом.

Инновационность.

Впервые будет проведено комплексное исследование молекулярных механизмов нарушений ответа НГ при различных патологических процессах. Уточнение субпопуляционного состава НГ при вирусных, бактериальных, вирусно-бактериальных процессах, разработка методов спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина, уточнение экспрессии генов цитокинов при патологических процессах (ИФН α , ИФН γ , ФНО α), создание моделей для перепрограммирования дефектно функционирующих НГ посредством пептидных и цитокиновых воздействий.

Информация о профильных публикациях:

1. Нестерова И. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А. и др Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах //Росс. иммунол. журн. -2010. - Т. 4 (13) - № 4. -С. 374-380, импакт – фактор журнала – 0,282.
2. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Спонтанная и индуцированная реструктуризация хроматина ядер нейтрофильных гранулоцитов при остром деструктивном панкреатите в стадии гнойных осложнений // Цитокины и воспаление. - 2010. – Т.9(2). – С.13-17, импакт – фактор журнала – 0,506.
3. Нестерова И. В., Ковалева С. В., Чудилова Г. А. и др Особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64(-)CD32(+)CD16(+)CD11b(+) и CD64(+) CD32(+)CD16(+)CD11b(+) пациентов с колоректальным раком под влиянием Г-КСФ, ИФН α и ИФН γ в системе in vitro. // Аллергол. и иммунол. -2011. -Т. 12, № 3. -С. 265-268, импакт – фактор журнала – 0,242.
4. Нестерова И. В., Евглевский А. А., Фомичева Е. В. и др. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислородзависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке

//Рос. иммунол. журн. -2011. -Т.5- (14),№ 3-4. -С. 254-261, импакт – фактор журнала – 0,282.

5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Сторожук С.В. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями // Цитокины и воспаление. -2011. -Т.10. - № 4. -С. 61-65, импакт – фактор журнала – 0,506..
6. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты. // Иммунология. -2012. -Т. 33. -№ 5. -С. 281-287, импакт – фактор журнала – 0,550.
7. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Тараканов В.А., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В., Кокова Л.Н., Стрюковский А.Е. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных. // Russian Journal of Immunology = Российский иммунологический журнал. -2012.- Т.6. -№ 2. - С. 170-176, импакт – фактор журнала – 0,282.
8. Евглевский А.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В. Особенности реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при хроническом миелолейкозе // Russian Journal of Immunology = Российский иммунологический журнал. -2012. - Т. 6. - № 4.- С.384-381, импакт – фактор журнала – 0,282.
9. Nesterova I.V., Kolesnikova NV, Kleshchenko EI . Chudilova G.A., Lomtatidze L.V.et al. Feature of transformation of the phenotype of CD64+CD16-CD32+ CD11b+, CD64+CD16+CD32+CD11b+,CD64-CD16+CD32+ CD11b+ subpopulation of monocytes in the congenital pneumonia in deep premature newborns. // International Journal of Immunorehabilitation.- 2013. – V.15(1) - P.37-38, импакт – фактор – 0,242.
10. Nesterova I.V. Kovaleva SV., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V. Defects of functioning of interferon and immune system and their correction in chronic active Epstein-Barr infection. In book: “From basic science to clinical application” . Moduzzieditore MEDIMOND International proceeding. - 2012.- P.187-191.
11. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Сапун О.И., Смерчинская Т.В. Особенности ремоделирования субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов у недоношенных детей с врожденной пневмонией на фоне респираторного дистресс-синдрома // Российский Аллергологический Журнал.- 2013.-№2 (2).- с.216-218.
12. Nesterova I.V., Evglevsky A.A., Fomicheva E.V., Kovaleva S.V. The restructurization of the chromatin of neutrophilic granulocytes in different types of pathologies and their diagnostic value International J. on Immunorehabilitation. – 2013. - V.15, N1. – P. 37-38.
13. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В. Ремоделирование структуры хроматина и изменение фенотипа нейтрофильных гранулоцитов под влиянием G-CSF у больных колоректальным раком в системе in vitro// Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3; URL: www.science-education.ru/117-13006 (дата обращения: 22.05.2014).
14. Nesterova I., Chudilova G., Lomtatidze L., Kovaleva S., Kletschenko E., Sapun O. Different manner of subpopulations of neutrophils and monocytes – partners’s myeloid phagocyte system , expressing the same membrane markers, in deep preterm newborns with congenital pneumonia// ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOPHYSIOLOGY: FROM BASIC SCIENCE TO CLINICAL MANAGEMENT. – MEDIMOND International Proceedings, 2014. – P.99-102.
15. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалёва С.В., Сапун О.И., Клещенко Е.И., Смерчинская Т.В. Ремоделирование фенотипа субпопуляций CD64–CD16+CD32+CD11b+ и CD64+CD16+CD32+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов

при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных// Российский иммунологический журнал. – 2014.- Т.8 (17), №1. – С.48-53.

16. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двудельный нейтрофильный гранулоцит: неоднозначность функционирования в реализации противоопухолевой защиты// Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2014. – Т.18, №4. – С. 3-12.

Информация о грантах:

1. Проект РФФИ № 09-04-96542 р_юг_а «Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах пищеварительной системы» (01.01.2009-31.12.2011гг.)
2. Проект РФФИ № 11-04-96533 р_юг_ц «Особенности трансформации фенотипа и функциональных свойств нейтрофильных гранулоцитов при инфекционно-воспалительных/гнойно-септических заболеваниях у детей» (01.01.2011-31.12.2012гг.)