

Научная статья

УДК 571.27:618.2:612.112.91

EDN UNFBTF

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-451-460



Фенотипические особенности гранулоцитов низкой плотности при физиологической беременности

Екатерина Григорьевна Орлова^{1, 2✉}, Ольга Александровна Логинова³,
Ольга Леонидовна Горбунова⁴, Сергей Викторович Ширшев⁵

^{1, 3-5} Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1, 2✉} orlova_katy@mail.ru

³ jallopukki@ya.ru

⁴ olia15_77@mail.ru

⁵ shirshev@iegm.ru

Аннотация. При физиологической беременности в периферической крови увеличивается количество нейтрофилов низкой плотности, однако их фенотипические и функциональные особенности практически не изучены. Поэтому цель данной работы – изучение экспрессии молекул, характеризующих цитотоксичность (CD16, CD107a), транспорт глюкозы (GLUT-1) и состояние митохондрий (по включению красителя MitoSpry™ Green FM) гранулоцитами низкой плотности и в общем пуле гранулоцитов при физиологически протекающей беременности. Объектом исследования была периферическая кровь условно здоровых женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Группу сравнения составили условно здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Гранулоциты низкой плотности анализировали как процент CD3⁺CD16⁺ клеток в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных на градиенте плотности фиколла-урографина (1.077 г/мл). Общий пул гранулоцитов исследовали как процент CD3⁺CD16⁺ клеток в гейте гранулоцитов периферической крови после удаления эритроцитов. Среди гранулоцитов выделяли субпопуляции с высокой экспрессией CD16 (CD16^{hi}) и сниженной (CD16^{int}). Установлено, что у небеременных CD16^{hi} гранулоциты доминируют как в общем пуле, так и среди гранулоцитов низкой плотности. В динамике беременности количество гранулоцитов низкой плотности увеличивается, а CD16^{int} гранулоциты становятся доминирующей субпопуляцией как в общем пуле гранулоцитов, так и среди гранулоцитов низкой плотности. У небеременных и беременных в I триместре CD16^{hi}- и CD16^{int}-гранулоциты низкой плотности и общего пула сравнимы по экспрессии GLUT-1, CD107a, массе и объему митохондрий. В III триместре экспрессия CD107a на CD16^{int}-гранулоцитах низкой плотности и в общем пуле снижается по сравнению с небеременными, а масса и объем митохондрий увеличиваются и в CD16^{hi}, и CD16^{int}-гранулоцитах только общего пула по сравнению с I триместром. Полученные результаты расширяют наше понимание механизмов регуляции функций гранулоцитов при физиологической беременности.

Ключевые слова: гранулоциты низкой плотности, CD107a, Glut-1, митохондрии, беременность

Для цитирования: Фенотипические особенности гранулоцитов низкой плотности при физиологической беременности / Е. Г. Орлова, О. А. Логинова, О. Л. Горбунова, С. В. Ширшев // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 451–460. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-451-460>.

Благодарности: работа выполнена при поддержке госзадания ИЭГМ УрО РАН (№ гос. регистрации 124020500027-7).

IMMUNOLOGY

Original article

Phenotypic features of low-density granulocytes in physiological pregnancy

Ekaterina G. Orlova^{1, 2✉}, Olga A. Loginova³, Olga L. Gorbunova⁴,
Sergey V. Shirshv⁵

^{1, 3-5} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, PFRC Ural Branch of the RAS, Perm, Russia

² Perm State University, Perm, Russia

^{1, 2} orlova_katy@mail.ru

³ jallopukki@ya.ru

⁴ olia15_77@mail.ru

⁵ shirshev@iegm.ru

Abstract. During physiological pregnancy, the number of low-density neutrophils in the peripheral blood increases, but their phenotypic and functional features have not been practically studied. Therefore, the aim of this work is to study the expression of molecules characterizing cytotoxicity (CD16, CD107a), glucose transport (GLUT-1) and the state of mitochondria (by the inclusion of the MitoSpyGreen FM dye) by low-density granulocytes and in the general pool of granulocytes during physiologically proceeding pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of conditionally healthy women in the first and third trimesters of physiological pregnancy. The comparison group consisted of conditionally healthy non-pregnant women in the follicular phase of the menstrual cycle. Low-density granulocytes were analyzed as a percentage of CD3⁺CD16⁺ cells in mononuclear leukocytes isolated on a ficoll-urographin density gradient (1.077 g/ml). The total granulocyte pool was studied as the percentage of CD3⁺CD16⁺ cells in the gate of peripheral blood granulocytes after removal of erythrocytes. Among granulocytes, subpopulations with high CD16 (CD16^{hi}) and reduced CD16^{int} expression were isolated. It was found that in non-pregnant women CD16^{hi} granulocytes dominate both in the general pool and among low-density granulocytes. During pregnancy, the number of low-density granulocytes increases and CD16^{int} granulocytes become the dominant subpopulation both in the general pool of granulocytes and among low-density granulocytes. In non-pregnant and pregnant women in the first trimester, CD16^{hi}- and CD16^{int}-granulocytes of low density and total pool are comparable in expression of GLUT-1, CD107a, mass and volume of mitochondria. In the third trimester, CD107a expression on low-density CD16^{int} granulocytes and in the general pool decreases compared to non-pregnant ones, and the mass and volume of mitochondria increase in both CD16^{hi} and CD16^{int} granulocytes of the general pool only compared to the first trimester. The results obtained expand our understanding of the mechanisms regulating granulocyte functions during physiological pregnancy.

Keywords: low-density granulocytes, CD107a, Glut-1, mitochondria, pregnancy

For citation: Orlova E. G., Loginova O. A., Gorbunova O.L., Shirshv S. V. [Phenotypic features of low-density granulocytes in physiological pregnancy]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 451-460. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-451-460>.

Acknowledgments: this study was carried out within the framework of the state task, the state topic registration number: N 124020500027-7.

Введение

Физиологическая беременность характеризуется глубокими изменениями функций клеток как адаптивного, так и врожденного иммунитета, что необходимо для выживания полуаллогенного плода и сохранения защитных свойств организма матери [Ширшев, 2009]. Нейтрофилы преобладают среди гранулоцитов периферической крови и являются ведущими эффекторами врожденного иммунитета. Их функции не ограничиваются обеспечением противомикробной защиты. Нейтрофилы активно инфильтруют ткани матки, стимулируют ангиогенез, выполняют регуляторные функции, участвуют в репарации, а стимуляция их фагоцитарной и цитотоксической активности ассоциирована со спонтанными абортми [Циркин и др., 2015; Потапнев, Гущина, Мороз, 2019]. При физиологической беременности происходит увеличение относительного и абсолютного содержания нейтрофилов в периферической крови, их фагоцитарная и цитотоксическая активность снижается, что является частью системного гормон-зависимого угнетения цитотоксических реакций при беременности и необходимо для сохранения плода [Ширшев, Куклина, Баженова, 2008; Патурова и др., 2018].

Физиологическая беременность характеризуется увеличением количества нейтрофилов низкой плотности [Denny et al., 2010; Ssemaganda et al., 2014; Ye et al., 2023]. Нейтрофилы низкой плотности выделяются вместе с фракцией мононуклеарных клеток периферической крови при разделении методом седиментации на градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см³) [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Подобные клетки присутствуют и у здоровых доноров вне беременности, но не превышают 1–2% [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Количество нейтрофилов низкой плотности значительно повышается при воспалении, аутоиммунных процессах, онкологических заболеваниях [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. При подобных патологических состояниях нейтрофилы низкой плотности характеризуются как преимущественно незрелые, избыточно экспрессирующие маркеры активации, способные к спонтанному формированию нейтрофильных ловушек, активной продукции провоспалительных цитокинов и цитотоксичности в отношении эндотелиальных клеток [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. При физиологической беременности нейтрофилы низкой плотности не отличаются по маркерам зрело-

сти/дифференцировки, активационного статуса, бактерицидности от нейтрофилов нормальной плотности [Ssemaganda et al., 2014; Deniset, Kubes, 2018], но имеют сниженную фагоцитарную активность [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Предполагается, что эти клетки способны к индукции формирования Т-регуляторных лимфоцитов в зоне фето-плацентарного контакта [Ssemaganda et al., 2014; Deniset, Kubes, 2018]. Однако их функциональные особенности, как и динамика их численности при физиологической беременности, остаются малоизученными.

Нейтрофилы периферической крови отличаются по экспрессии молекулы CD16 – рецептора к Fc-фрагментам IgG, необходимого для фагоцитоза IgG-опсонизированных патогенов [Asakura et al., 2002]. Гранулоциты с высокой экспрессией CD16 (CD16^{hi}) и средней экспрессией CD16 (CD16^{int}) дифференцированы по степени зрелости и характеризуются разной адгезионной способностью к активированному эндотелию и экстравазации, что определяет их разную активность при воспалении, дополнительно предполагая участие в изменении иммунореактивности при беременности [Boron et al., 2022]. В немногочисленных исследованиях показано, что нарушение субпопуляционного состава CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов и их функций ассоциировано со спонтанными абортными в ранние сроки беременности [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008]. В наших предыдущих исследованиях показано, что при физиологической беременности нарастает доля (CD16^{int}) нейтрофилов в общем пуле гранулоцитов периферической крови, а количество CD16^{hi} гранулоцитов снижается, метаболическая активность CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов увеличивается к концу беременности [Орлова и др., 2024]. Однако особенности экспрессии CD16 на гранулоцитах низкой плотности и их метаболический статус при физиологической беременности не изучены.

В большинстве работ гранулоциты низкой плотности описываются как избыточно активированные клетки, что предполагает их высокую метаболическую активность [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. Для большинства клеток иммунной системы глюкоза является основным энергетическим субстратом и поступает в клетку при помощи белков-транспортёров (GLUT-1), а количество и состояние митохондрий отражают активность основных метаболических путей [Stojkov et al., 2022]. Поэтому целью данной работы является изучение экспрессии молекул, характеризующих цитотоксичность (CD16, CD107a), транспорт глюкозы (GLUT-1) и состояние митохондрий (MitoSpyTM Green FM) нейтрофилов низкой плотности и общей фракции гранулоцитов в разные trimestры физиологической беременности.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась венозная кровь женщин в I и в III trimestрах физиологической беременности (табл. 1). Группу сравнения составили условно-здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла, сравнимые по возрасту с исследуемыми группами. Использовались следующие критерии включения: добровольное информированное согласие на использование биологического материала, наличие одной и более успешных беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных, гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов. Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. с ее последующими изменениями или сопоставимым нормам этики и одобрено локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол № 16 от 05.06.2022).

Таблица 1

Характеристика участников исследования [Characteristics of study participants]

Исследуемые группы	Количество	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	6	20.5 (20–27)	-
Беременные, I триместр	7	31 (25–32)	12 (10–12)
Беременные, III триместр	6	29 (25–32)	31 (30–32)

Примечание. Возраст и срок беременности представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей Me(Q1-Q3).

Венозную кровь получали из локтевой вены утром натощак в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта после 8 ч. голодания. Собранную кровь делили на две равные части. Для анализа нейтрофилов низкой плотности выделяли фракцию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МНПК). Для этого одну часть крови разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:1, наслаивали на фиколл (1.077 г/см³) и центрифугировали 40 мин при 400 g. МНПК собирали пипетированием с границы раздела фаз, затем ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), дважды отмывали центрифугированием по 5 мин. при 300 g. Для исследования общего пула гранулоцитов из второй части крови уда-

ляли эритроциты с помощью лизирующего буфера (BioLegend, USA). Окрашивание моноклональными антителами проводили согласно инструкции производителя. Характеристика использованных антител представлена в табл. 2. Фенотип клеток анализировали на проточном цитометре «CytoFlex S» (BeckmanCoulter, США) с использованием программы «CytExpert 2.0» (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 100 000 событий в каждой пробе. Для уменьшения неспецифического связывания и адгезии клеток окрашивание проводили в ФСБ, содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% БСА, без использования консервантов. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие изотипические и негативные контроли. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1.

Таблица 2

Характеристика антител
[Antibodies characteristic]

Антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Производитель
CD3	PE	ОКТ3	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend, USA
CD16	Pacific blue™	3G8	Mouse IgG1, κ	BioLegend, USA
CD107a	APC	H4A3	Mouse IgG1, κ	BioLegend, USA
GLUT-1	PE-Cy5.5	Polyclonal	Rabbit IgG	Biorbyt, Great Britain

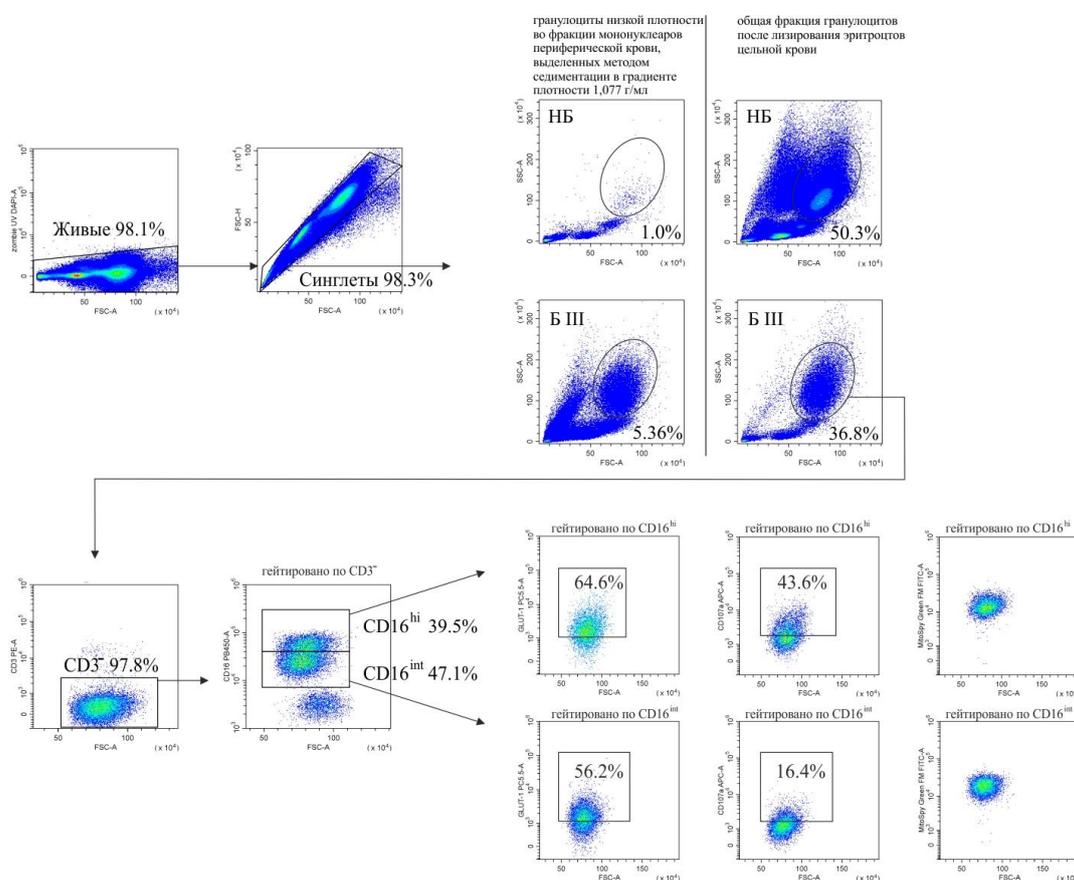


Рис. 1. Стратегия гейтирования гранулоцитов

[Granulocyte gating strategy]

Последовательно: определение региона живых клеток с использованием красителя Zombie UV™; определение одиночных неслипшихся клеток (синглетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/ FSC-H); выделение гранулоцитарного гейта по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания в периферической крови во фракции мононуклеарных клеток после выделения на градиенты фиколла (нейтрофилы низкой плотности у НБ и в III триместре (Б III) или в общей фракции гранулоцитов периферической крови после лизирования эритроцитов (общая фракция гранулоцитов у НБ и в III триместре (Б III)); определение CD3⁺ клеток в гейте гранулоцитов; выделение CD16^{hi} и CD16^{int} субпопуляций среди CD3⁺CD16⁺ гранулоцитов; оценка экспрессии GLUT-1, CD107a среди CD16^{hi}- и CD16^{int}-клеток; определение включения флюоресцентного красителя MitoSpy™ Green FM в CD16^{hi}- и CD16^{int}-клетки.

Представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента

Статистический анализ проводили с помощью программы Prism v.8.0.1 (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних квартилей (UQ). Достоверность различий между группами: небеременные – НБ (группа сравнения); беременные в I триместре (Б I); беременные в III триместре (Б III) определяли с использованием критерия Крускала-Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди гранулоцитов периферической крови доминирующей популяцией являются нейтрофилы (более 93%) [Кишкун, 2013]. При изучении гранулоцитов низкой плотности во фракции МНПК также показано, что эти клетки относятся к нейтрофильным гранулоцитам [Torell et al., 2023]. В проведенном исследовании показано, что у здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста процент гранулоцитов низкой плотности от фракции МНПК составляет 1.37% (0.96–3.72), а при беременности увеличивается: в I триместре – 5.83% (3.77–21.54; $p < 0,05$ к НБ), в III триместре – 3.21% (0.64–6.99) (рис. 1), что согласуется с работами других авторов [Torell et al., 2023]. У небеременных CD16^{hi}-нейтрофилы являются преобладающей субпопуляцией как в общем пуле гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности (рис. 2). Ранее подобные результаты для общей фракции нейтрофилов описаны и другими авторами для доноров обоих полов [Kamp et al., 2012; Medara et al., 2021; Martin et al., 2022]. Считается, что CD16^{hi}-нейтрофилы являются более зрелыми и проявляют большую цитотоксичность по сравнению с CD16^{int}-нейтрофилами [Kamp et al., 2012]. В динамике беременности соотношение CD16^{hi}/CD16^{int}-клеток меняется аналогичным образом как среди общей фракции нейтрофилов, так и среди нейтрофилов низкой плотности: количество CD16^{hi} – снижается, а CD16^{int}-клеток увеличивается пропорционально сроку беременности (рис. 2). Нарастание пропорции CD16^{int}-клеток в периферической крови на фоне развития нейтрофильного лейкоцитоза, по-видимому, объясняется стимулирующим влиянием гормонов плаценты на миелопоэз и выходом менее зрелых форм нейтрофилов в периферическую кровь. Можно полагать, что системное угнетение цитотоксических реакций клеток адаптивного иммунитета, участвующих в антимикробной защите, при беременности компенсируется увеличением количества нейтрофилов, тогда как вопрос о причинах увеличения количества нейтрофилов низкой плотности при физиологической беременности остается открытым [Hassani et al., 2020]. Согласно данным литературы, нейтрофилы низкой плотности включают как незрелые формы, так и зрелые, которые приобретают характеристики данной популяции под влиянием активационных факторов [Hassani et al., 2020]. По-видимому, при беременности увеличение количества нейтрофилов низкой плотности в периферической крови обусловлено стимуляцией миелопоэза гормонами плаценты.

Цитотоксическую активность нейтрофилов оценивали по экспрессии молекулы CD107a (белок мембраны гранул), появление которой на поверхности клетки свидетельствует о ее дегрануляции и выбросе содержимого гранул во внеклеточное пространство. Анализ присутствия CD107a показал, что у небеременных женщин и в I триместре беременности количество CD107a-позитивных клеток не отличалось в субпопуляциях CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов как в общей фракции, так и среди нейтрофилов низкой плотности (рис. 3). В III триместре беременности процент CD16^{int}-нейтрофилов, экспрессирующих CD107a, достоверно снижался по сравнению с небеременными как в общей фракции, так и среди нейтрофилов низкой плотности. Учитывая преобладание CD16^{int}-нейтрофилов к концу беременности, можно сделать вывод о снижении цитотоксичности как общего пула нейтрофилов периферической крови, так и нейтрофилов низкой плотности в III триместре физиологической беременности. Таким образом, полученные результаты дополняют наше понимание механизмов снижения антимикробной резистентности организма матери, характерное для физиологической беременности.

Известно, что увеличение экспрессии GLUT-1 отражает усиление потребления глюкозы и активации метаболических процессов в клетке [Martin et al., 2022]. Краситель MitoSpy Green может избирательно накапливаться в матриксе митохондрий, где связывается белками [Cottet-Rousselle et al., 2011]. Накопление MitoSpy Green в клетке прямо пропорционально массе и объему митохондриального компартмента, что свидетельствует об усилении биогенеза энергетических органелл [Cottet-Rousselle et al., 2011]. Установлено, что у небеременных CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилы как в общем пуле, так и среди клеток низкой плотности, не отличались по экспрессии GLUT-1 и способности накапливать MitoSpy Green, что свидетельствует об их сходной метаболической активности. В I триместре беременности экспрессия GLUT-1, масса и объем митохондрий достоверно не менялись в сравнении с небеременными женщинами. В III триместре масса и объем митохондрий достоверно увеличивались в CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилах общего пула, тогда как среди гранулоцитов низкой плотности присутствовала подобная тенденция, но она не являлась достоверной (рис. 3B). Таким образом, можно заключить, что метаболическая активность нейтрофилов увеличивается к концу беременности, что, по-видимому, сопряжено с активацией в них синтетических процессов.

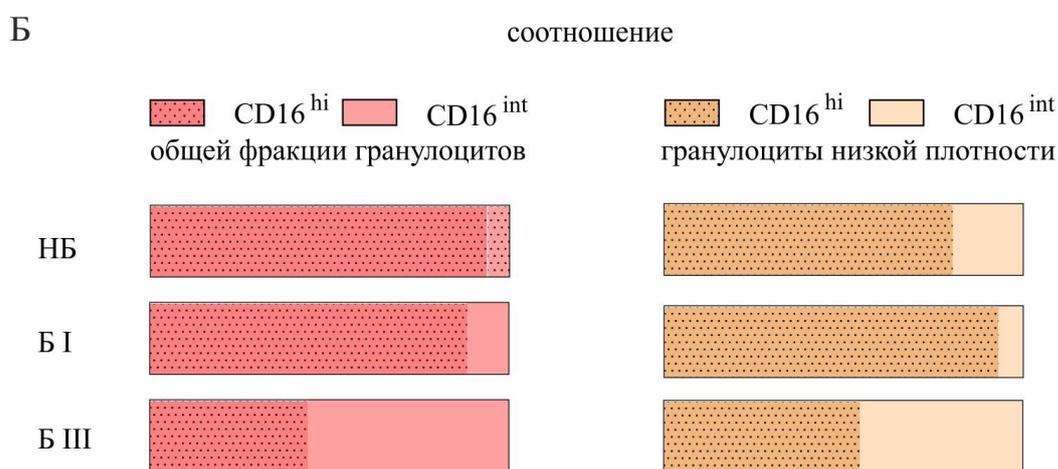
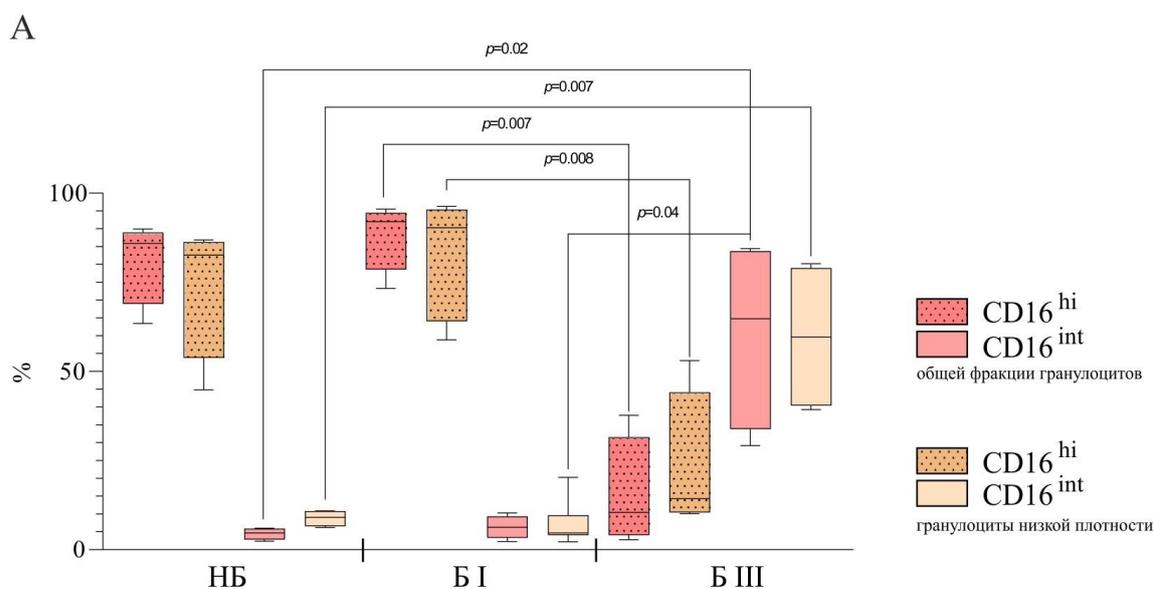


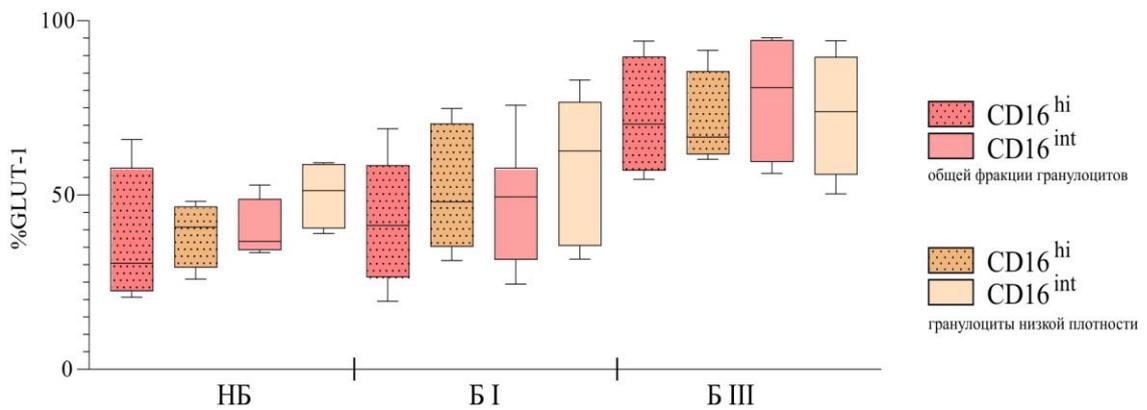
Рис. 2. Процентное содержание (А) и соотношение (Б) CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов в общей фракции гранулоцитов и среди гранулоцитов низкой плотности у небеременных (НБ), беременных в I (Б I) и III триместрах (Б III).

Данные (А) представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1-Q3); процентное соотношение CD16^{hi}/CD16^{int}-клеток; значения «р» представлены по критерию Крускала-Уоллиса с апостериорным тестом Данна [Percentage (A) and ratio (B) of CD16^{hi}- and CD16^{int}-neutrophils in the total fraction of granulocytes and among low-density granulocytes in non-pregnant (НБ), pregnant women in I (Б I) and III trimesters (Б III).

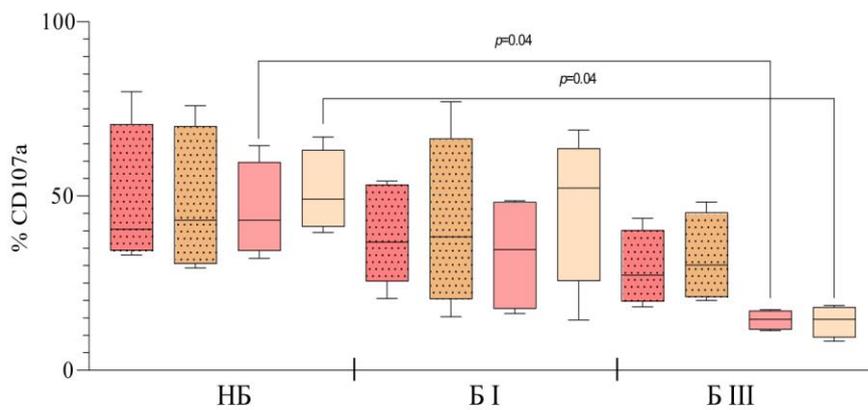
Data (A) are presented in the form of median and interquartile range, Me (Q1-Q3); percentage ratio of CD16^{hi}/CD16^{int} cells; values of "p" are presented according to the Kruskal-Wallis criterion with the posteriori Dunn test]

Согласно данным литературы и нашим ранее проведенным исследованиям, гормоны, продуцируемые плацентой при беременности, оказывают мощные модулирующие эффекты на функциональную активность нейтрофилов периферической крови [Некрасова, Ширшев, 2013; Патурова и др., 2018]. Можно полагать, что выявленные нами функциональные особенности нейтрофилов при беременности также объясняются влиянием гормонов плаценты, поскольку нейтрофилы экспрессируют специфические рецепторы к гормонам беременности [Revelli, Mascobrio, Tesarik, 1998]. Учитывая способность нейтрофилов к инфильтрации тканей матки и участию в иммунном отторжении, модуляция их цитотоксической активности важна не только для обеспечения антимикробной резистентности, но и благополучного течения беременности. Полученные результаты раскрывают новые механизмы регуляции функциональной активности нейтрофилов при беременности.

А



Б



В

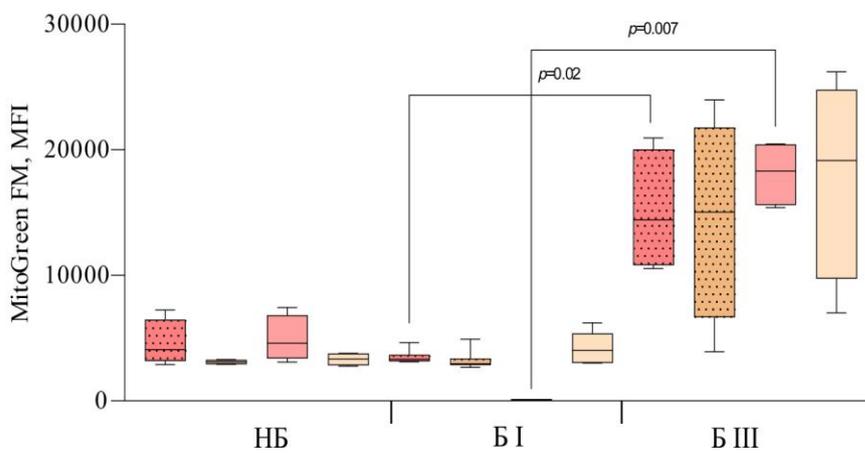


Рис. 3. Процент $CD16^{hi}$ - и $CD16^{int}$ -гранулоцитов, позитивных по экспрессии GLUT-1 (А), CD107a (Б), включению митохондриального зонда MitoSpy Green (В) в общей фракции гранулоцитов и среди гранулоцитов низкой плотности у небеременных (НБ), беременных в I (Б I) и III триместрах (Б III).

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1-Q3); (Б) по оси ординат представлена медиана интенсивности флуоресценции (MFI, Median Fluorescence Intensity) в клетках, содержащих MitoSpy Green FM; значения «р» представлены по критерию Крускала-Уоллиса

[The percentage of $CD16^{hi}$ - and $CD16^{int}$ -granulocytes positive for the expression of GLUT-1 (A), CD107a (B), the inclusion of MitoSpy Green mitochondrial probe (B) in the total fraction of granulocytes and among low-density granulocytes in non-pregnant (НБ), pregnant women in the I (Б I) and III trimesters (Б III)]

Заключение

Таким образом, при физиологически протекающей беременности в периферической крови увеличивается количество гранулоцитов низкой плотности. В динамике беременности количество CD16^{int}-нейтрофилов нарастает, а CD16^{hi}-нейтрофилов снижается как в общей фракции гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности. Различия между нейтрофилами низкой плотности и общей фракции гранулоцитов выявлены по показателям метаболической активности в III триместре беременности. Также в III триместре беременности CD16^{int}-нейтрофилы характеризуются меньшей цитотоксичностью как в общей фракции гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности по сравнению с CD16^{hi}-нейтрофилами. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций нейтрофилов при беременности и перспективны для направленной модуляции функций нейтрофилов периферической крови.

Список источников

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 976 с.
2. Некрасова И.В., Ширшев С.В. Женские половые стероидные гормоны в регуляции ферментативной активности нейтрофилов // Доклады Академии наук. 2013. Т. 453, № 6. С. 690.
3. Орлова Е.Г. и др. Метаболические особенности гранулоцитов периферической крови при физиологической беременности // Вестник уральской медицинской академической науки. 2024. Т. 21, № 3. С. 233–241.
4. Патурова И.Г. и др. Негеномное влияние прогестерона на радикальную активность нейтрофилов женщин при беременности, в родах и с угрозой преждевременных родов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018. № 4. С. 506–514.
5. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии // Иммунология. 2019. № 5. С. 84–96. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009.
6. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции // Биохимия. 2008. Т. 73, № 4. с. 483–497.
7. Циркин В.И. и др. Роль нейтрофилов в физиологическом течении беременности и родов и некоторых акушерских осложнениях // Вестник Уральской академической науки. 2015. № 4. С. 75–86.
8. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург, 2009. 582 с.
9. Ширшев С.В., Куклина Е.М., Баженова А.В. Влияние прогестерона на фагоцитарную и окислительную активность моноцитов и нейтрофилов // Вестник Пермского университета. 2008. Вып. 9(25) Биология. С. 87–90.
10. Asakura H. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9 // J. Immunol. 2002. Vol. 169. P. 5912–5918.
11. Boron D.G. et al. Galectin-1 and galectin-9 concentration in maternal serum: implications in pregnancies complicated with preterm prelabor rupture of membranes // J. of clin. Med. 2022. Vol. 11, № 21. Art. 6330.
12. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity // Semin. Immunopathol. 2013. Vol. 35, № 4. P. 455–463. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
13. Cottet-Rousselle C. et al. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes // Cytometry Part A. 2011. Vol. 79, № 6. P. 405–425. DOI: 10.1002/cyto.a.21061.
14. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fi de subsets or polarization states? // J. Leuk. Biol. 2018. Vol. 103, № 5. P. 829–838. DOI: 10.1002/JLB.3R10917-361R.
15. Denny M.F. et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs // J. Immunol. 2010. Vol. 184, № 6. P. 3284–3297. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199.
16. Hassani M. et al. On the origin of low-density neutrophils // J. Leukoc. Biol. 2020. Vol. 107, № 5. P. 809–818.
17. Kamp V.M. et al. Human suppressive neutrophils CD16^{bright}/CD62L^{dim} exhibit decreased adhesion // J. Leukoc. Biol. 2012. Vol. 92, № 5. P. 1011–1020. DOI: 10.1189/jlb.0612273.
18. Martin C. et al. Specific circulating neutrophils subsets are present in clinically stable adults with cystic fibrosis and are further modulated by pulmonary exacerbations // Front. Immunol. 2022. № 13. Art. 1012310. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1012310.
19. Medara N. et al. Peripheral neutrophil phenotypes during management of periodontitis // J. Periodontal Res. 2021. Vol. 56, № 1. P. 58–68. DOI: 10.1111/jre.12793.
20. Ning X., Wang W.M., Jin H.Z. Low-density granulocytes in immune-mediated inflammatory diseases // J. Immunol. Res. 2022. Art. e1622160. DOI: 10.1155/2022/1622160.
21. Revelli A., Mascobrio M., Tesarik J. Monogenetic actions of steroid hormones in reproductive tissues // Endocr. Rev. 1998. Vol. 19, № 3. P. 3–17.

22. Ssemaganda A. et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 2. Art. e85696. DOI: 10.1371/journal.pone.0085696.
23. Stojkov D. et al. Physiological and pathophysiological roles of metabolic pathways for NET formation and other neutrophil functions // Front. Immunol. 2022. № 13. Art. e826515. DOI: 10.3389/fimmu.2022.826515.
24. Torell A. et al. Low-density granulocytes are related to shorter pregnancy duration but not to interferon alpha protein blood levels in systemic lupus erythematosus // Arthritis Res. Ther. 2023. Vol. 25, № 1. Art. 107. DOI: 10.1186/s13075-023-03092-w.
25. Yang P. et al. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function // J. Immunol. Res. 2019. Art. e8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
26. Ye H. et al. Dysregulated low-density granulocyte contributes to early spontaneous abortion // Front. Immunol. 2023. № 14. Art. e1119756. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119756.

References

1. Kishkun A.A. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics: a textbook]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2009. 582 p. (In Russ.).
2. Nekrasova I.V., Shirshv S.V. [Female sex steroid hormones in the regulation of enzymatic activity of neutrophils]. *Doklady Akademii nauk*. No. 6 (2013): pp. 690. (In Russ.).
3. Orlova E.G., Loginova O.A., Gorbunova O.L., Shirshv S.V. [Metabolic features of peripheral blood granulocytes in physiological pregnancy]. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademičeskoj nauki*. No. 3 (2024): pp. 233-241. (In Russ.).
4. Paturova I.G., Polezhaeva T.V., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Zaitseva O.O., Bratukhina O.A., Dmitrieva S.L., Tsikin V.I. [The non-genomic effect of progesterone on the radical activity of neutrophils in women during pregnancy, childbirth and with the threat of premature birth]. *Rossijskij fiziologičeskij žurnal im. I.M. Sečanova*. No. 4 (2018): pp. 506-514. (In Russ.).
5. Potapnev M.P., Gushchina L.M., Moroz L.A. [Phenotypic and functional heterogeneity of neutrophil subpopulations in normal and pathological conditions]. *Immunologija*. No. 5 (2019): pp. 84-96. (In Russ.).
6. Rapoport E.M., Kurmyshkina O.V., Bovin N.V. [Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity and functions]. *Biochimija*. No. 4 (2008): pp. 483-497. (In Russ.).
7. Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Khlybova S.V., Dmitrieva S.L., Popova V.S. [The role of neutrophils in the physiological course of pregnancy and childbirth and some obstetric complications]. *Vestnik Ural'skoj akademičeskoj nauki*. No. 4 (2015): pp. 75-86. (In Russ.).
8. Shirshv S.V. *Immunologija materinsko-fetal'ny'ch vzaimodejstvij* [Immunology of maternal-fetal interactions]. Ekaterinburg, 2009. 582 p. (In Russ.).
9. Shirshv S.V., Kuklina E.M., Bazhenova A.V. [The effect of progesterone on the phagocytic and oxidative activity of monocytes and neutrophils]. *Vestnik Permskogo universiteta*. Iss. 9(25) Biologija (2008): pp. 87-90. (In Russ.).
10. Asakura H., Kashio Y., Nakamura K., Seki M., Dai S., Shirato Y. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J. Immunol.* V. 169 (2002): pp. 5912-5918.
11. Boron D.G., Swietlicki A., Potograbski M., Kurzawinska G., Wirstlein P., Boron D., Drews K., Seremak-Mrozikiewicz A. Galectin-1 and galectin-9 concentration in maternal serum: implications in pregnancies complicated with preterm prelabor rupture of membranes. *J. of clin. Med.* V. 11 (2022). Art. 6330.
12. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* V. 35, No. 4 (2013): pp. 455-463. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
13. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*. V. 79, No. 6 (2011): pp. 405-425. DOI: 10.1002/cyto.a.21061.
14. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fi de subsets or polarization states? *J. Leuk. Biol.* V. 103, No. 5 (2018): pp. 829-838. DOI: 10.1002/JLB.3R10917-361R.
15. Denny M.F., Yalavarti S., Zhao V., Thacker S.G., Anderson M., Sandy A.R. et al. A separate group of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus causes vascular damage and synthesizes type I IFN. *Journal of Immunology*. V. 184, No. 6 (2010): pp. 3284-3297. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199.
16. Hassani M., Hellebrekers P., Chen N., van Aalst C., Bongers S., Hietbrink F., Koenderman L., Vriskoop N. On the origin of low-density neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* V. 107, No. 5 (2020): pp.809-818.
17. Kamp V.M., Pillay J., Lammers J.W., Pickkers P., Ulfman L.H., Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J. Leukoc. Biol.* V. 92, No. 5 (2012): pp. 1011-1020. DOI: 10.1189/jlb.0612273.
18. Martin C., Dhote T., Ladjemi M.Z., Andrieu M., Many S., Karunanithy V. et al. Specific circulating neutrophils subsets are present in clinically stable adults with cystic fibrosis and are further modulated by pulmonary exacerbations. *Front. Immunol.* V. 13 (2022). Art. 1012310. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1012310.

19. Medara N., Lenzo J.C., Walsh K.A., Reynolds E.C., O'Brien-Simpson N.M., Darby I.B. Peripheral neutrophil phenotypes during management of periodontitis. *J. Periodontal Res.* V. 56, No. 1 (2021): pp. 58-68. DOI: 10.1111/jre.12793.
20. Ning X., Wang W.M., Jin H.Z. Low-density granulocytes in immune-mediated inflammatory diseases. *J. Immunol Res.* (2022). Art. e1622160. DOI: 10.1155/2022/1622160.
21. Revelli A., Mascobrio M., Tesarik J. Monogenetic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* V. 19, No. 3 (1998): pp. 3-17.
22. Ssemaganda A., Kindinger L., Bergin P., Nielsen L., Mpendo J., Ssetaala A. et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One.* V. 9, No. 2 (2014). Art. e85696. DOI: 10.1371/journal.pone.0085696.
23. Stojkov D., Gigon L., Peng S., Lukowski R., Ruth P., Karaulov A. et al. Physiological and pathophysiological roles of metabolic pathways for NET formation and other neutrophil functions. *Front. Immunol.* V. 13 (2022). Art. e826515. DOI: 10.3389/fimmu.2022.826515.
24. Torell A., Stockfelt M., Larsson G., Blennow K., Zetterberg H., Leonard D. et al. Low-density granulocytes are related to shorter pregnancy duration but not to interferon alpha protein blood levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* V. 25, No 1 (2023). Art. 107. DOI: 10.1186/s13075-023-03092-w.
25. Yang P., Li Y., Xie Y., Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J. Immunol. Res.* (2019). Art. e8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
26. Ye H., Li L., Dong Y., Zheng Q., Sha Y., Li L. et al. Dysregulated low-density granulocyte contributes to early spontaneous abortion. *Front. Immunol.* No. 14 (2023). Art e1119756. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119756.

Статья поступила в редакцию 21.10.2024; одобрена после рецензирования 25.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 21.10.2024; approved after reviewing 25.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Е. Г. Орлова – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции; доцент кафедры микробиологии и иммунологии;

О. А. Логинова – канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции;

О. Л. Горбунова – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции;

С. В. Ширшев – д-р мед. наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции.

Information about the authors

E. G. Orlova – doctor of biology, leading researcher of laboratory of immunoregulation, associate professor of the department of microbiology and immunology;

O. A. Loginova – candidate of biology, junior researcher of laboratory of immunoregulation;

O. L. Gorbunova – candidate of biology, researcher of laboratory of immunoregulation;

S. V. Shirshv – doctor of medical sciences, head of laboratory of immunoregulation.

Вклад авторов:

Орлова Е. Г. – концепция исследования и написание статьи.

Логинова О. А. – статистическая обработка и графическое представление результатов.

Горбунова О. Л. – оформление статьи, работа с текстом.

Ширшев С. В. – научное руководство, итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Orlova E. G. – research concept and writing of the review.

Loginova O. A. – statistical processing and graphical representation of the results.

Gorbunova O. L. – the design of the article, working with the text.

Shirshv S. V. – research supervision, final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.