

# МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ГЕКСАПЕПТИДА НА ИЗМЕНЕННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> И CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Тетерин Ю.В.<sup>1</sup>, Чапурина В.Н.<sup>1</sup>, Чичерев Е.А.<sup>1</sup>,  
Тараканов В.А.<sup>1</sup>, Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

**Резюме.** Проблема острого остеомиелита у детей занимает одно из центральных мест среди воспалительных заболеваний костно-мышечной системы. Причинами являются возникшие в организме инфекционные процессы, распространившиеся на костную ткань при различных дисрегуляторных процессах иммунной системы, и в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов. Представляет интерес изучение субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов, образующихся при включении клетки в воспалительный процесс, при остром остеомиелите у детей и определение возможности влияния на уровень экспрессии рецепторов для коррекции их функций. Целью исследования явилась оценка влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> детей с острым остеомиелитом в эксперименте *in vitro*. Исследованы образцы периферической крови детей 10-17 лет с острым остеомиелитом (гематогенным или посттравматическим, n = 12) при поступлении в стационар и условно здоровых детей (n = 7). Образцы крови детей с острым остеомиелитом инкубировали с гексапептидом (10<sup>-6</sup> г/л) 60 мин, T 37 °C. Проводили определение содержания субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов, оценку плотности экспрессии мембранных рецепторов (FC 500, Beckman Coulter, США); исследовали фагоцитарную функцию с учетом степени завершенности фагоцитарного акта в отношении *S. aureus*. Установлено, что при остром остеомиелите выявлено значительное увеличение в 8,5 раз доли активированной субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ, на фоне снижения субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и изменения ее фенотипа – CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup>НГ в сравнении с показателями условно здоровых детей. При этом отмечено увеличение количества активно фагоцитирующих клеток, но снижение показателей, характеризующих процессы захвата и переваривания бактериального анти-

**Адрес для переписки:**

Нестерова Ирина Вадимовна  
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»  
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.  
Тел.: 8 (916) 187-73-41.  
E-mail: inesterova1@yandex.ru

**Address for correspondence:**

Nesterova Irina V.  
Peoples' Friendship University of Russia  
117513, Russian Federation, Moscow,  
Leninsky ave., 123, apt 1.  
Phone: 7 (916) 187-73-41.  
E-mail: inesterova1@yandex.ru

**Образец цитирования:**

Г.А. Чудилова, Ю.В. Тетерин, В.Н. Чапурина,  
Е.А. Чичерев, В.А. Тараканов, И.В. Нестерова  
«Модулирующие эффекты гексапептида  
на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных  
гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>  
и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> детей с острым  
остеомиелитом в системе *in vitro*» // Российский  
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 571-576.  
doi: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

© Чудилова Г.А. и соавт., 2022

**For citation:**

G.A. Chudilova, Yu.V. Teterin, V.N. Chapurina,  
E.A. Chicherev, V.A. Tarakanov, I.V. Nesterova  
“Modulating effects of hexapeptide on the altered phenotype of  
neutrophil granulocyte CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> and  
CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> subsets in children with  
acute osteomyelitis in the *in vitro* system”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,  
Vol. 25, no. 4, pp. 571-576.  
doi: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

DOI: 10.46235/1028-7221-1206-MEO

гена. Показано, что гексапептид в эксперименте *in vitro* модулирует фенотипы обеих изучаемых субпопуляций в CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ, способствуя восстановлению уровня экспрессии рецепторов до показателей группы сравнения и фагоцитарной активности как процессов захвата, так и переваривающей способности клеток. Таким образом, установлено значительное доминирование диагностически значимой активированной субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ при остром остеомиелите у детей. Показано, что гексапептид в системе *in vitro* модулирует фенотипы субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, при этом восстанавливая фагоцитарную активность клеток. В перспективе полученные результаты могут послужить основой при разработке новых эффективных терапевтических схем лечения.

*Ключевые слова:* нейтрофильные гранулоциты, фенотип субпопуляций, острого остеомиелит, гексапептид, дети

## MODULATING EFFECTS OF HEXAPEPTIDE ON THE ALTERED PHENOTYPE OF NEUTROPHIL GRANULOCYTE CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> AND CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> SUBSETS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS IN THE *IN VITRO* SYSTEM

Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Teterin Yu.V.<sup>a</sup>, Chapurina V.N.<sup>a</sup>, Chicherev E.A.<sup>a</sup>, Tarakanov V.A.<sup>a</sup>, Nesterova I.V.<sup>a, b</sup>

<sup>1</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

<sup>2</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The problem of acute osteomyelitis in children is of special importance among the inflammatory diseases of musculoskeletal system, due to infectious conditions arising in the body and spreading to the bone tissue caused by impaired immune regulation, first of all, concerning neutrophilic granulocytes. Of interest is studying the subsets of neutrophilic granulocytes arising when the cells are involved into the inflammatory process in acute pediatric osteomyelitis, and determining the opportunity to influence the level of receptor expression aiming for correction of their functions. The purpose of our study was to evaluate the effect of hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine on the altered phenotype of neutrophilic granulocytes in children with acute osteomyelitis using an *in vitro* experimental model. We examined the peripheral blood samples from children with acute hematogenous or post-traumatic osteomyelitis at the age of 10 to 17 years (n = 12) upon their admission to the hospital, and from healthy children (n = 7). Blood samples from children with acute osteomyelitis were incubated with hexapeptide (10<sup>-6</sup> g/L) for 60 min, at 37 °C. The content of neutrophilic granulocyte subsets (CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> and CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>), expression density of appropriate membrane receptors were assessed by flow cytometric technique (FC 500 "Beckman Coulter", USA). Phagocytic function was studied by assessing the degree of completed phagocytosis of *S. aureus*. It was found that, in acute osteomyelitis, a 8.5-fold increased proportion of activated CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG subset with the CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>NG phenotype was revealed, along with a decrease in the CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>NG subset and changes in the CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup>NG phenotype as compared with reference indexes of healthy children. At the same time, an increased number of actively phagocytic cells was noted, however, with decreased indexes characterizing capture and digestion of the bacterial antigen. In the *in vitro* experiments, the tested hexapeptide was shown to modulate the phenotypes of both studied subsets (CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup> and CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>dim</sup>NG), thus promoting restoration of the receptor expression levels to the reference group values, as well as phagocytic activity, in terms of uptake and digestive capacity of microbial cells. Thus, the dominance of a diagnostically significant activated CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> neutrophil subset with the CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>NG phenotype was found in acute osteomyelitis in children. The results of *in vitro* studies have shown that the hexapeptide caused phenotypic modulation of the CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> neutrophils, and CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>NG subsets, along with recovery of their phagocytic activity. In the future, our results may provide a basis for the development of new effective therapeutic regimens.

*Keywords:* neutrophilic granulocytes, subset phenotypes, acute osteomyelitis, hexapeptide, children

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

## Введение

Трудно поддающиеся лечению глубокие инфекции, такие как остеомиелит (ОМ), остаются серьезной проблемой здравоохранения во всем мире [1, 5, 8] ОМ у детей отмечается в период укрепления и формирования костей. Причинами являются инфекционные процессы, возникшие в организме и распространившиеся на костную ткань при различных дисрегуляторных процессах иммунной системы. *S. aureus* из-за уникальной способности внедряться, колонизировать и размножаться в костной ткани является высоко специфическим патогеном при ОМ [1].

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) хорошо известны своим вкладом в антимикробную защиту, эффективно уничтожая *S. aureus* посредством фагоцитоза, продукции антимикробных пептидов, активных форм кислорода, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов и образования нейтрофильных внеклеточных ловушек [7]. При этом дисфункции НГ связаны с различными воспалительными сигналами в патогенезе инфекции. *S. aureus* может выживать в фагоцитирующих НГ и в непрофессиональных фагоцитах остеоцитах и остеобластах в костной нише [9]. Процесс интернализации внутрь этих клеток достигается с помощью MSCRAMMs FnBPA и FnBPB, связывающихся с фибриногеном и соединяющихся с интегринами  $\alpha 5\beta 1$  на НГ или макрофагах [4]. Кроме того, MSCRAMM, такие как ClfA, ClfB, поверхностно-заякоренные белки (SdrC, SdrD и SdrE) и поверхностный белок SasG, способствуют агрегации бактерий и образованию биопленок на различных биологических поверхностях [4]. *S. aureus* препятствует комплемент-опосредованной опсонизации и фагоцитозу за счет секреции белков вирулентности — CHIPS, SCIN, CoA и внеклеточного фибриноген-связывающего белка (Efb) [4]. НГ, моноциты и, в меньшей степени, Т-клетки рекрутируются в зону инфекционного воспаления, где сформирована бактериальная биопленка [6]. В ответ на это вырабатываются и высвобождаются хемокины, такие как CXCL8, IL-1 $\beta$ , или воспалительные белки макрофагов CXCL2 и CCL3, которые впоследствии привлекают и активируют еще большее количество НГ, создавая воспалительную микросреду, которая способствует образованию костно-резорбирующих остеокластов [6]. Основными гистопатологическими находками при ОМ являются нейтрофильные инфильтраты, определяемые в них живые микроорганизмы, тромбированные кровеносные сосуды, что свидетельствует о дефектном функционировании НГ. Способность НГ к роллингу,

хемотаксису и готовности включения микробного арсенала зависит от поверхностных мембранных рецепторов CD62L (селектин L, LAM), CD16 (Fc $\gamma$ RIII), CD63 (тетраспанин LAMP-3), CD11b (Mac-1, CR3A). Рецептор адгезии CD62L необходим для перемещения НГ к очагу воспаления. CD63 — основной компонент мембраны лизосом и белок-посредник в передаче сигналов, влияющий на созревание и активацию НГ, оказывая регуляторное воздействие на адгезивную активность CD11/CD18. По уровню экспрессии CD63 можно судить об интенсивности активности миелопероксидазы [3]. CD11b (в присутствии субъединицы CD18) с миелопероксидазой индуцирует запуск каскада внутриклеточных сигнальных адаптерных структур, которые приводят к регулируемой дегрануляции НГ, активности NADPH-оксидаз и увеличению поверхностной экспрессии как CD11b, CD16 так и CD64 (Fc $\gamma$ RI), CD32 (Fc $\gamma$ RII), TLR, CD40, CD80, CD86, HLA-DR в аутокринной манере [3]. Учитывая высокую пластичность рецепторного аппарата НГ и появление разных субпопуляций НГ при включении клетки в воспалительный процесс, интерес представляет их определение при ОМ и оценка возможности влияния на уровень экспрессии молекул иммунотропными препаратами для корректировки их функций. В этой связи целью нашего исследования явилась оценка влияния гексапептида (ГП)-аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на измененный фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> детей с острым остеомиелитом в эксперименте *in vitro*.

## Материалы и методы

Исследованы образцы периферической крови (ПК) детей 10-17 лет (n = 12) с острым остеомиелитом гематогенным или посттравматическим (ОМ) в первый день поступления в хирургический стационар (группа 1) и 7 условно здоровых детей сопоставимых по возрасту (группа сравнения). ПК детей с ОМ инкубировали с ГП (в концентрации 10<sup>-6</sup> г/л) в течение 60 мин при T 37 °C. ГП — синтетический аналог активного центра гормона тимуса — тимопоэтина, который обладает всеми биологическими активностями нативного гормона тимуса [2]. Известно, что ГП связывается с рецепторами на различных клетках иммунной системы, в том числе на НГ, обладает иммунорегуляторными свойствами, способен восстанавливать баланс окислительно-антиокислительных реакций, инактивировать свободно-радикальные и перекисные соединения.

Проводили цитофлуориметрическую оценку доли содержания в ПК НГ субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> с учетом плотности экспрессии мембранных

рецепторов по показателю интенсивности флуоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США; МкАТ, Beckman Coulter International S.A., Франция). Параллельно исследовали фагоцитарные функции НГ: тестировали содержание активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН); определяли объем захваченного бактериального материала (*S. aureus*, штамм 209) по показателям фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки завершения фагоцитарного акта-переваривания определялся процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

Статистическую обработку данных осуществляли в компьютерных программах Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. После оценки нормальности распределения лабораторных показателей использовали непараметрические статистических критерии Вилкоксона–Манна–Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Статистически значимые различия определяли при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

При тестировании НГ условно здоровых детей в ПК отмечалось наличие двух субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>. Доля субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> составляла 89,5 (81,5-96,8) %, а CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ – 7,5 (0,3-8,7) %. Обе субпопуляции статистически значимо не отличались по уровню экспрессии поверхностных мембранных рецепторов CD16 и CD11b НГ (p > 0,05). При этом преобладающая субпопуляция имела более высокий уровень MFI CD62L – 7,1 (5,4-9,3) против 4,5 (3,5-8,8) на субпопуляции НГ дополнительно экспрессирующей CD63 с MFI 2,2 (1,7-3,2) (табл. 1).

При исследовании НГ ПК детей с ООМ выявлено значимое увеличение доли CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ в 8,5 раз по сравнению с показателями определяемыми в группе сравнения (p < 0,05). Также на мембране НГ данной субпопуляции установлено усиление

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ГЕКСАПЕПТИДА НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> И CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. EFFECT OF HEXAPEPTIDE ON PHENOTYPE OF CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup> AND CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup> NEUTROPHIL GRANULOCYTES SUBPOPULATIONS OF CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

	Группа сравнения Comparison group	Группа 1 Group 1	Группа 1 + ГП Group 1 + HP
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ</b> CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>-</sup> NG			
НГ, % NG, %	89,5 (81,5-96,8)	36,9* (20,8-52,0)	41,0* (30,3-45,5)
MFI CD16	129,5 (115,7-131,7)	115,0* (97,5-105,0)	127^ (106,0-159,5)
MFI CD62L	7,1 (5,4-9,3)	11,2* (10,9-13,5)	10,5 (9,1-12,0)
MFI CD11b	16,40 (9,6-20,9)	17,8 (16,2-27,5)	11,1 (9,3-14,5)
<b>CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ</b> CD16 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD63 <sup>+</sup> NG			
НГ, % NG, %	7,5 (0,3-8,7)	64,0* (48,6-82,5)	56,6* (51,7-68,4)
MFI CD16	127,0 (112,7-130,0)	137* (130,5-160,0)	122,5^ (109,5-128,8)
MFI CD62L	4,5 (3,5-8,8)	11,2* (9,8-13,1)	10,2 (9,7-12,0)
MFI CD11b	15,4 (14,9-15,9)	26,0* (17,2-39,8)	13,4^ (10,4-16,5)
MFI CD63	2,2 (1,7-3,2)	1,4 (1,3-1,7)	1,3 (1,2-1,4)

Примечание. \* – различия между показателями группы 1 и группы сравнения, p < 0,05; ^ – различия между показателями группы 1 и группы 1 + ГП, p < 0,05.

Note. \*, differences between the indicators of group 1 and the comparison group, p < 0.05; ^, differences between the indicators of group 1 and group 1 + HP, p < 0.05.

экспрессии поверхностных рецепторов CD16, CD62L, CD11b, на фоне неменяющегося MFI CD63, который значимо не отличался от показателей группы сравнения (табл. 1).

В группе 1 показано снижение доли субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ ( $p < 0,05$ ). Кроме того эта субпопуляция характеризовалась более низкой MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и повышенными уровнями MFI CD62L ( $p < 0,05$ ) и CD11b ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Таким образом, при ООМ отмечается увеличение количества НГ активированной субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ. Известно, что активированные НГ обладают высоким цитотоксическим и протеолитическим потенциалом, а также способностью повреждению тканей [3]. Кроме этого наблюдается негативное изменение рецепторного оснащения 2-й субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ с формированием фенотипа CD16<sup>dim</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup>НГ, который отличается повышенной способностью мигрировать в очаг воспаления, но обладает пониженным биоцидным потенциалом. Если предположить, однако, что бактерии организованы в виде биопленки и что инфильтрация в эту биопленку необходима для фагоцитоза бактерий, наши данные могут в некоторой степени объяснить, почему, несмотря на активацию, НГ не в состоянии контролировать инфекцию, но при этом высвобождают свой цитотоксический, протеолитический и коллагенолитический потенциал. Так обнаружено, что показатели фагоцитарной функции НГ в ПК детей с ООМ статистически значимо отличались от показателей группы сравнения, наблюдалось увеличение количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН) до 66 (58,5-71,1) % против 55 (50,0-57,0) %, что свидетельствовало об активации ответа на инфекционный процесс. Однако отмечалось снижение показателей, характеризующих процессы захвата бактериального антигена – ФЧ 3,8 (2,8-3,9) против 4,84 (4,1-7,05)  $p < 0,05$ ; ФИ 2,3 (2,0-2,7) против 2,71 (2,2-3,73) в группе сравнения. На этом фоне показано снижение %П 47,8 (47,2-54,0) % против 62,64 (57,9-62,92) % и ИП

1,28 (1,02-1,31) против 1,57 (1,34-1,88) в группе сравнения ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ).

Инкубация ПК детей с ООМ в системе *in vitro* с ГП позволила выявить модулирующие эффекты на фенотип НГ изучаемых субпопуляций при ООМ.

Показано усиление экспрессии MFI CD16 ( $p < 0,05$ ), на фоне снижения MFI CD62L ( $p > 0,05$ ) и CD11b ( $p > 0,05$ ) в субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ – с приобретением фенотипа CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>-</sup> (табл. 1). При этом эффекты влияния ГП на субпопуляцию CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ проявлялись снижением MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и MFI CD62L ( $p > 0,05$ ) и CD11b ( $p < 0,05$ ). Под действием ГП плотность экспрессии CD63 не менялась – CD16<sup>mid</sup>CD62L<sup>mid</sup>CD11b<sup>mid</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ. Ожидается, что снижение способности к миграции НГ из кровеносного сосуда в инфицированный участок, снизит негативное влияние активированных при ООМ клеток. Интересно отметить, что на фоне перераспределения оснащенности рецепторами, снижения уровня молекул обеспечивающих хемотаксис, при анализе фагоцитарной функции НГ отмечалось восстановление функций переваривания (%П-57,4 (53,6-61,1); ИП-1,6 (1,3-1,8), на фоне интенсивного захвата *S. aureus* (%ФАН – 76 (70-77); ФЧ – 3,6 (3,3-3,9), ФИ – 2,7 (2,4-3,1).

## Заключение

Таким образом, установлено значительное доминирование диагностически значимой активированной субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ с фенотипом CD16<sup>bright</sup>CD62L<sup>bright</sup>CD11b<sup>bright</sup>CD63<sup>dim</sup>НГ. Показано, что гексапептид в эксперименте *in vitro* модулирует фенотипы субпопуляций CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>-</sup>НГ и CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD63<sup>+</sup>НГ, приближая их к значениям группы сравнения при этом восстанавливая фагоцитарную активность клеток. В перспективе это даст возможность разработке наиболее эффективных терапевтических схем лечения, сократить продолжительность антибиотикотерапии, ускорить купирование воспалительного процесса, значительно снизив рост серьезных осложнений.

## Список литературы / References

1. Гаврилюк В.П., Сталина М.И., Северинов Д.А., Машошина Л.О. Иммунные и метаболические нарушения при остром гематогенном остеомиелите у детей // Вятский медицинский вестник, 2022. № 1 (73). С. 90-96. [Gavrilyuk V.P., Statina M.I., Severinov D.A., Mashoshina L.O. Immune and metabolic disorders in acute hematogenous osteomyelitis in children. *Vyatskiy meditsinskiy vestnik = Vyatka Medical Bulletin*, 2022, no. 1 (73), pp. 90-96. (In Russ.)]
2. Кологривова Е.Н., Плешко Р.И., Щербик Н.В., Староха А.В., Чичинская Э. Влияние интраназального применения Имунофана на активность фагоцитов при комплексной терапии экссудативного среднего отита у детей // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 741-750. [Kologrivova E.N., Pleshko R.I., Scherbik N.V., Starokha A.V., Chichinskaya E. Effects of intranasal Imunofan administration upon phagocytic activity in treatment of exudative otitis media in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2020, Vol. 22 (4), pp. 741-750. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOI-1720.

3. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. Под ред. Нестеровой И.В., Чудиловой Г.А. UK, USA, Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 с. [Neutrophil granulocytes: reflection in the mirror of modern ideas. Ed. Nesterova I.V., Chudilova G.A. UK, USA]. Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 p.
4. Brandt S.L., Putnam N.E., Cassat J.E., Serezani C.H. Innate immunity to staphylococcus aureus: evolving paradigms in soft tissue and invasive infections. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, pp. 3871-3880.
5. Bryan A.J., Abdel M.P., Sanders T.L., Fitzgerald S.F., Hanssen A.D., Berry D.J. Irrigation and debridement with component retention for acute infection after hip arthroplasty: improved results with contemporary management. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2017, Vol. 99, no. 23, pp. 2011-2018.
6. Dapunt U., Giese T., Maurer S., Stegmaier S., Prior B., Hänsch G.M., Gaida M.M. Neutrophil-derived MRP-14 is up-regulated in infectious osteomyelitis and stimulates osteoclast generation. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 4, pp. 575-582.
7. Rigby K.M., DeLeo F.R. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. *Semin. Immunopathol.*, 2012, Vol. 34, pp. 237-259.
8. Tande A.J., Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, Vol. 27, no. 2, pp. 302-345.
9. Yang D., Wijenayaka A.R., Solomon L.B., Pederson S.M., Findlay D.M., Kidd S.P., Atkins G.J. Novel insights into staphylococcus aureus deep bone infections: the involvement of osteocytes. *mBio*, 2018, Vol. 9, no. 2, e00415-18. doi: 10.1128/mBio.00415-18.

**Авторы:**

**Чудилова Г.А.** — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Тетерин Ю.В.** — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Чапурина В.Н.** — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Чичерев Е.А.** — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Тараканов В.А.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Нестерова И.В.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

**Authors:**

**Chudilova G.A.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Teterin Yu.V.**, Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Chapurina V.N.**, Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Chicherev E.A.**, Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Tarakanov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Nesterova I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Faculty of Continuing Medical Education, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation