

ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Нестерова И.В.^{1, 2}, Чудилова Г.А.¹, Тетерин Ю.В.¹, Чичерев Е.А.¹,
Чапурина В.Н.¹, Тараканов В.А.¹, Барова Н.К.¹

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Условием распространения инфекционного процесса в кости при остром остеомиелите (ООМ) является негативное влияние *S. aureus*, нарушение его элиминации из-за дисфункции иммунной системы (ИС), в частности нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Коррекция дисфункций НГ при ООМ через модуляцию фенотипа субпопуляций НГ под влиянием иммуностимулирующих веществ и цитокинов представляет интерес. Цель исследования – уточнить эффекты влияния рекомбинантного IFN α 2b на количество и фенотип субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и фагоцитарную функцию нейтрофильных гранулоцитов при остром остеомиелите у детей в системе *in vitro*.

Проведено исследование образцов периферической крови (ПК) детей 8-15 лет: с ООМ (n = 24) – группа исследования 1 (ГИ1), условно здоровых детей (n = 13) – группа сравнения (ГС). ПК детей с ООМ инкубировали с рекIFN α 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37 °С) – группа исследования 1а (ГИ1а). До и после инкубации с рекIFN α 2b определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флуоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США), фагоцитарную активность НГ по содержанию активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН), объему захваченного бактериального патогена *S. aureus* (штамм 209) по показателям – фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности – процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

При ООМ была выявлена субпопуляция, экспрессирующая HLA-DR-рецептор – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺НГ, отсутствующая в ПК детей ГС, с праймированным фенотипом:

Адрес для переписки:

Чудилова Галина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар,
ул. Митрофана Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Address for correspondence:

Galina A. Chudilova
Kuban State Medical University
4 Mitrofan Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation.
Phone: +7 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, Ю.В. Тетерин,
Е.А. Чичерев, В.Н. Чапурина, В.А. Тараканов,
Н.К. Барова «Эффекты влияния рекомбинантного
IFN α 2b на содержание антигенпрезентирующей
субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺
нейтрофильных гранулоцитов у детей с острым
остеомиелитом в системе *in vitro*» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 689-696.
doi: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

© Нестерова И.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, Yu.V. Teterin, E.A. Chicherev,
V.N. Chapurina, V.A. Tarakanov, N.K. Barova “In vitro effects
of recombinant IFN α 2b on the content of antigen-presenting
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subset of neutrophils
in children with acute osteomyelitis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 4, pp. 689-696.
doi: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

© Nesterova I.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.46235/1028-7221-13769-IVE

увеличенной плотностью экспрессии активационных рецепторов CD16 и CD66b. Инкубация ПК при ООМ с рекIFN α 2b приводила к увеличению доли субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, активно фагоцитирующих НГ, и улучшению процессов переваривания.

В настоящем исследовании показано появление у детей с ООМ активированной субпопуляции «долгоживущих» НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ со свойствами АПК представляющими АГ Т-лимфоцитам, с сохраняющимися эффекторными свойствами. В экспериментальной системе *in vitro* продемонстрировано позитивное влияние рекIFN α 2b, приводящее к увеличению количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и восстановлению фагоцитарной функции НГ по отношению к *S. aureus*, что может быть использовано в будущем для разработки новых подходов к оптимизации комплексной терапии в послеоперационном периоде лечения ООМ, профилактики осложнений и возможности реставрации нарушений в иммунной системе.

Ключевые слова: дети, острый остеомиелит, нейтрофильные гранулоциты, антигенстимулирующая субпопуляция, рекомбинантный IFN α 2b, фенотип

IN VITRO EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE CONTENT OF ANTIGEN-PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBSET OF NEUTROPHILS IN CHILDREN WITH ACUTE OSTEOMYELITIS

**Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Chicherev E.A.^a,
Chapurina V.N.^a, Tarakanov V.A.^a, Barova N.K.^a**

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Negative impact of *S. aureus*, seems to be a sufficient condition for the spread of the infectious process in the bone in acute osteomyelitis (AOM) due to its altered elimination caused by dysfunction of the immune system (IS), in particular, of neutrophilic granulocytes (NG). Correction of NG dysfunction in AOM under the influence of immunotropic substances and cytokines via modulation of the NG phenotypic subsets is of sufficient interest. Our aim was to evaluate the *in vitro* effects of recombinant IFN α 2b on the number and phenotype of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subsets and on phagocytic function of neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children.

The study of peripheral blood (PB) samples from children aged 8-15 years was carried out as follows: patients with AOM (n = 24) comprised study group 1 (SG1), healthy children (n = 13) were included into comparison group (CG). PB samples of children with AOM were incubated with recIFN α 2b (50 IU/ μ L, 60 min, 37 °C.) in the study group 1a (SG1a). Before and after incubation with recIFN α 2b, the number of NG subsets CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ and the density values of receptor expression by fluorescence intensity (MFI) were also determined (FC 500, Beckman Coulter, США). Phagocytic activity of NCs was evaluated as the contents of actively phagocytic NCs (%PhAN), volume of the engulfed *S. aureus* (strain 209) by assessing their phagocytic number (PhN), phagocytic index (PhI). Bacterial killing was determined as the percentages of microbe digestion (%D), digestion index (DI).

The cells from AOM patients revealed a subset expressing the HLA-DR receptor—CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺NG, which is absent in the PB of CG children. The cells with primed phenotype exhibited an increased expression density of activation receptors CD16 and CD66b. Incubation of PB in AOM with recIFN α 2b led to an increased proportion of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NG subset which showed active phagocytosis and improved digestion processes. The present study shows the emergence of activated subset of “long-lived” CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NCs in children with AOM. This subpopulation has APC features, by presenting AG to T lymphocytes, with preserved effector properties. In an *in vitro* experimental system, a positive effect of recIFN α 2b was demonstrated, leading to an increased number of NGs of the

CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subset and recovery of *S. aureus* phagocytosis by NGs, thus being promising in the future for development of new approaches to optimization of complex therapy in the postoperative period of AOM treatment, prevention of complications and the opportunity to alleviate the disorders in the immune system.

Keywords: acute osteomyelitis, children, neutrophilic granulocytes, antigen-stimulating subpopulation, recombinant IFN α 2b, phenotype

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

Введение

Остеомиелит (ОМ) – гнойно-некротический процесс, развивающийся в кости и костном мозге (КМ), под воздействием высоко специфического патогенна *S. aureus*. *S. aureus* способен внедряться, колонизировать и размножаться в костной ткани, продуцируя факторы вирулентности: деградация тканей хозяина, прилипание к компонентам внеклеточного матрикса, образование биопленок, для уклонения от уничтожения фагоцитами [1, 2]. В ответ на это вырабатываются хемокины CXCL8, IL-1 β , CXCL2 и CCL3, которые привлекают и активируют большое количество НГ, создавая воспалительную среду, которая способствует образованию костно-резорбирующих остеокластов. Важнейшим условием распространения инфекционного процесса в кости является как негативное влияние самого *S. aureus*, так и нарушение его элиминации из-за дисфункции иммунной системы (ИС) и, в первую очередь, нейтрофильных гранулоцитов (НГ) [1, 15].

НГ являются фенотипически и функционально гетерогенными клетками, которые не только эффективно уничтожают патогены посредством фагоцитоза, продукции антимикробных пептидов, активных форм кислорода, секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, образования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET), но и участвуют в перекрестных взаимодействиях с другими популяциями лейкоцитов, обеспечивая связь между врожденным и адаптивным иммунитетом [5, 10].

Показано, что НГ КМ, подвергшиеся воздействию GM-CSF, IL-3, TNF α , интерферонами (IFN γ) и бактериальными продуктами, экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA класса II (MHC-II), дифференцируются в гибриды нейтрофил-DC, демонстрируя DC-подобный фенотип и антигенпрезентирующую функцию, сохраняя при этом свойства НГ [10, 13]. НГ могут влиять на адаптивный иммунный ответ, модулируя ответы CD4⁺T-клеток через молекулы MHC-II [9]. Кроме того, рецептор CD66b, экспрессируемый исключительно на

НГ, может функционировать как рецептор для галектина-3, который экспрессируется CD4⁺T-клетками памяти, на низком уровне – наивными T-клетками [9]. Взаимодействия рецептор-лиганд между T-клетками памяти и НГ инициируют экспрессию MHC-II на мембране НГ, происходит дальнейшая амплификация лигирования MHC-TCR, в результате активируется большее количество T-клеток, секретирующих цитокины, вызывающие увеличение экспрессии MHC-II на мембране НГ. Эта петля положительной обратной связи может играть центральную роль в индукции и поддержании презентации антигена НГ [9]. Установлено, что субпопуляции НГ, экспрессирующие HLA-DR, дополнительно экспрессируют ко-рецепторы CD80 и CD49d и характеризуются значительно увеличенной продолжительностью жизни. При этом «долгоживущие» НГ HLA-DR⁺ содержат больше миелопероксидазы (MPO), у них повышены фагоцитарный индекс и адгезия, их отличает ограниченная способность к хемотаксису и экзоцитозу первичных и вторичных гранул по сравнению с НГ-HLA-DR⁻[4]. При ООМ у детей нами была определена антигенпрезентирующая субпопуляция НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, экспрессирующая высокоспецифические маркеры НГ (CD66b, CD16, CD33) и позитивная по HLA-DR [11].

CD66b (CEACAM8), GPI-заякоренный гликопротеин суперсемейства Ig, экспрессируется исключительно на НГ со стадии промиелоцитов, – маркер активации НГ [7]. CD16 (Fc γ RIII) рецептор – маркер палочкоядерных и сегментированных НГ и их активации. При контакте с антигеном происходит быстрая транслокация рецептора из цитоплазматического депо НГ на его поверхность. Повышенная экспрессия мембранных CD16 на НГ свидетельствует об активации клетки, а сниженная экспрессия или полное отсутствие CD16 характеризует незрелость НГ и/или «обратную дифференцировку» клетки, которая наблюдается при тяжелых бактериальных инфекциях или некрозах тканей [5]. CD33 (Siglec-3), принадлежит суперсемейству Ig, содержит два домена (IgV и IgC2) – маркер дифференцировки миелоидных клеток. Плотность экспрессии CD33 постепенно снижается от стадии миелобластов до сегментоядерных НГ. Вну-

триклеточная часть CD33 содержит ингибиторные мотивы на основе тирозина (ITIM), которые участвуют в ингибировании клеточной активности [8].

Следует подчеркнуть, что HLA-DR, который экспрессируется на миелобластах, отсутствует на зрелых НГ, но экспрессируется на поверхности тканевых НГ при хронических воспалительных состояниях [14]. Иммунный ответ на бактерии в костях имеет уникальные особенности по сравнению с другими инфицированными тканями и значительно модифицируется локальными факторами. Повышенная активация и функциональная способность НГ-HLA-DR⁺ предполагает наличие праймированного фенотипа [4], в связи с этим интерес представляет оценка возможности влияния на уровень экспрессии поверхностных рецепторов альтернативными иницирующими сигналами, в т. ч. на экспрессию HLA-DR НГ с целью возможной корректировки функций НГ.

Цель исследования – уточнить эффекты влияния рекомбинантного IFN α 2b на количество и фенотип субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и фагоцитарную функцию нейтрофильных гранулоцитов при остром остеомиелите у детей в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Проведено исследование образцов периферической крови (ПК) 24 детей с острым (ООМ) 8-15 лет – группа исследования 1 (ГИ1). Группу сравнения (ГС) составили образцы ПК 13 здоровых детей в возрасте 8-15 лет.

Для оценки влияния рекомбинантного IFN α 2b образцы ПК детей с ООМ инкубировали с рекIFN α 2b (50 МЕ/мкл, 60 мин, 37 °C) – группа исследования 1a (ГИ1a).

До и после инкубации с рекIFN α 2b определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ и плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флуоресценции (MFI) (FC 500, Beckman Coulter, США), фагоцитарную активность НГ по содержанию активно-фагоцитирующих НГ (%ФАН), объему захваченного бактериального патогена *S. aureus* (штамм 209) по показателям – фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ); для оценки киллинговой активности – процент переваривания (%П), индекс переваривания (ИП).

У всех законных представителей пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и забор крови согласно WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава РФ.

Статистическая обработка данных проводилась компьютерной программой Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2020. После оценки нормальности распределения лабораторных показателей использовали критерии Вилкоксона–Манна–Уитни. Представление результатов в виде медианы (верхний и нижний квартиль) – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Определение статистически значимых различий при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в ПК условно-здоровых детей ГС регистрируется субпопуляция CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ доля которой составляет 98,8 (98,0–100)%. Фенотип данной субпопуляции: низкая плотность экспрессии маркеров НГ по MFI CD66b – 4,6 (4,2–5,0), CD33 – 3,7 (3,3–4,6) и средние значения MFI CD16 – 81,45 (69,3–99,2), характеризует зрелые палочкоядерные и сегментоядерные НГ [3].

В ПК ГИ1 детей с ООМ показано снижение в 1,4 раза доли НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ до 71,2 (62,5–78,5)% относительно 98,8 (98,0–100)% в ГС ($p < 0,05$). При этом наблюдалась увеличение плотности экспрессии рецепторов по MFI CD16 до 114,5 (100,3–139,0) против 81,45 (69,3–99,2) и CD66b до 6,2 (5,7–7,3) против 4,6 (4,2–5,0) ($p_{1,2} < 0,05$) и неменяющемся MFI CD33– 2,9 (2,5–3,4) ($p > 0,05$) относительно ГС, дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов CD16, CD66b рецепторов на мембрану демонстрирует активированный фенотип НГ, способных к дегрануляции, окислительный взрыву и фагоцитозу НГ [4] (табл. 1).

В то же время при ООМ была выявлена субпопуляция экспрессирующая HLA-DR рецептор – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺НГ, отсутствующая в ПК детей ГС, доля которой составила 29,9 (18,4–37,6)%. Плотность экспрессии была определена по MFI HLA-DR – 2,2 (1,8–4,0), MFI CD33 – 3,5 (3,3–4,2), при этом плотность экспрессии рецепторов CD66b и CD16 была сопоставима с показателями субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻НГ (табл. 1).

Инкубация ПК ГИ1 при ООМ с рекIFN α 2b приводила к перераспределению доли содержания субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ (табл. 1).

Отмечалось снижение количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ – 49,0 (41,4–61,1) % против 71,2 (52,5–80,5) % до инкубации ($p > 0,05$). При этом выявлено увеличение плотности экспрессии в 1,3 раза CD66b – 8,7 (7,6–8,9) против 6,23 (5,7–7,3) в ГИ1 ($p < 0,05$) и

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ И ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ И CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ ПРИ ОСТРОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ ДО И ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ СИСТЕМЕ *IN VITRO* С РЕКОМБИНАНТНЫМ IFN α 2b, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT AND PHENOTYPE OF CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ AND CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ NEUTROPHILIC GRANULOCYTE SUBSETS IN ACUTE OSTEOMYELITIS BEFORE AND AFTER *IN VITRO* INCUBATION WITH RECOMBINANT IFN α 2b, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group n = 13	Группа исследования 1 до инкубации с рекIFN α 2b Study group 1 before incubation with recIFN α 2b n = 24	Группа исследования 1а после инкубации с рекIFN α 2b Study group 1a after incubation with recIFN α 2b n = 24
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻			
НГ, % NG, %	98,8 (98,0-100,0)	71,2* (62,5-78,5)	49,0* ^ (41,4-61,1)
MFI CD66b	4,6 (4,2-5,0)	6,2 (5,7-7,3)	8,7* ^ (7,6-8,9)
MFI CD16	81,5 (69,3-99,2)	114,5 (100,3-139,0)	104,7 (74,3-119,9)
MFI CD33	3,7 (3,3-4,6)	2,9 (2,5-3,4)	2,5* (2,1-2,5)
CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺			
НГ, % NG, %	0	29,9* (18,4-37,6)	45,0* ^ (38,9-58,9)
MFI CD66b	0	8,20 (6,5-9,0)	8,7 (7,6-8,9)
MFI CD16	0	112,5 (100,3-137,0)	104,0 (73,7-120,8)
MFI CD33	0	3,5 (3,3-4,2)	3,5 (2,8-3,8)
HLA-DR	0	2,2 (1,8-4,0)	1,6 (1,5-2,0)

Примечание. * – значимые различия между показателями группы сравнения и группы исследования (ООМ), $p < 0,05$; ^ – значимые различия между показателями группы исследования до и после инкубации *in vitro* с рекIFN α 2b, $p < 0,05$.

Note. *, significant differences between the indicators of the comparison group and the study group (AOM) $p < 0.05$; ^, significant differences between the parameters of the study group before and after *in vitro* incubation with recIFN α 2b, $p < 0.05$.

снижение MFI CD33 до 2,5 (2,1-2,5) против 2,9 (2,5-3,4) до инкубации ($p < 0,05$). Выявлено отсутствие эффектов влияния рекIFN α 2b по отношению к MFI CD16 рецепторов (табл. 1).

При этом определялось более высокое количество НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ – 45,0 (38,9-58,9) % против 29,9 (18,4-37,6) % ($p < 0,05$) в ГИ1 до инкубации с рекIFN α 2b. С плотностью экспрессии рецепторов CD66b, CD16, CD33 и HLA-DR не отличающихся от значений ГИ1 до инкубации ($p_{1-4} > 0,05$) (табл. 1).

При исследовании фагоцитарной функции после инкубации с рекIFN α 2b НГ в ГИ1а с ООМ в системе *in vitro* отмечено повышение %ФАГ до 76,0 (70,0-77,0) % против 51,0 (42,8-58,3) % ($p < 0,05$) в группе исследования и 54,7 (51,0-57,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$). Также установлено увеличение киллинговой способности

НГ с 41,9 (37,8-44,8) % в группе исследования с ООМ до 57,4 (53,6-61,1) % ($p < 0,05$), т. е. практически до показателей группы сравнения 64,5 (62,6-66,9) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, данные полученные в результате проведенного эксперимента *in vitro* продемонстрировали возможность позитивного влияния рекIFN α 2b на функционирование НГ при ООМ. Установлено повышение содержания субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ «долгоживущих» НГ, обладающих уникальным профилем DC-подобных клеток с антигенпрезентирующей функцией, которые, по литературным данным, способны презентировать суперантиген *Staphylococcus enterotoxin E* (SEE) Т-клеткам, связываясь с молекулами МНС II класса [6]. «Долгоживущие» НГ, обладающих уникальным профилем DC-подобных клеток, продуцируют

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α 2b НА ФАГОЦИТАРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. EFFECTS OF RECOMBINANT IFN α 2b ON THE PHAGOCYTIC FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN ACUTE OSTEOMYELITIS *IN VITRO*, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group n = 13	Группа исследования 1 до инкубации с рекIFN α 2b Study group 1 before incubation with reclFN α 2b n = 24	Группа исследования 1a после инкубации с рекIFN α 2b Study group 1a after incubation with reclFN α 2b n = 24
%ФАН %PhAN	54,7 (51,0-57,0)	51,0 (42,8-58,3)	76,0* ^ (70,0-77,0)
ФЧ PhN	4,4 (3,8-4,7)	1,9* (1,7-2,3)	2,7* (2,2-3,5)
ФИ PhI	1,9 (1,7-2,2)	1,0* (0,9-1,5)	2,0 (1,5-2,7)
%П %D	64,5 (62,6-66,9)	41,9* (37,8-44,8)	57,4* ^ (53,6-61,1)
ИП DI	1,7 (1,5-2,0)	0,5* (0,3-0,7)	0,9* (0,5-1,4)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

значительные количества IL-8, IL-1 β , рецепторного антагониста IL-1, при этом не только сохраняя, но и усиливая эффекторные свойства короткоживущих НГ [3].

Результаты исследования также подтверждают гипотезу о способности НГ трансформироваться с «классического» фенотипа на фенотип «долгоживущих нейтрофилов» под влиянием от экстрацеллюлярного окружения клеток [3]. Детекция новой антигенпредставляющей субпопуляции НГ со смешанным нейтрофильно-дендритным фенотипом при остром остеомиелите у детей, возможно, связано с гнойно-инфекционным процессом, затрагивающим не только костные ткани, но и костный мозг. При этом следует отметить, что ранее появление молекул CD66b и HLA-DR на мембране НГ наблюдали только при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях (лейшманиоз) и аутоиммунных процессах (грануломатоз Вегенера и ревматоидный артрит) [4]. Выявленный нами эффект позитивного влияния IFN α 2b в системе *in vitro* демонстрирует пластичность субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR: их трансфор-

мацию в сторону увеличения, субпопуляции с антигенпрезентирующими свойствами, что необходимо, с нашей точки зрения, для достижения полноценной регрессии гнойного воспалительного процесса.

Заключение

В настоящем исследовании показано появление у детей с ООМ активированной субпопуляции «долгоживущих» НГ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ со свойствами АПК представляющими АГ Т-лимфоцитам [12] с сохраняющимися эффекторными свойствами.

В экспериментальной системе *in vitro*, продемонстрировано позитивное влияние рекIFN α 2b, приводящее к увеличению количества НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и восстановлению фагоцитарной функции НГ по отношению к *S. aureus*, что может быть использовано в будущем разработки новых подходов к оптимизации комплексной терапии в послеоперационном периоде лечения ООМ, профилактике осложнений и возможности реставрации нарушений в иммунной системе.

Список литературы / References

1. Белокрылов Н.М., Щепалов А.В., Антонов Д.В., Белокрылов А.Н., Жужгов Е.А. К вопросу об остеомиелите и его последствиях у детей: обзор литературы // Пермский медицинский журнал, 2020. Т. 37, № 3. С. 40-57. [Belokrylov N.M., Schepalov A.V., Antonov D.V., Belokrylov A.N., Zhuzhgov E.A. On the issue of osteomyelitis and its consequences in children: a literature review. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2020, Vol. 37, no. 3, pp. 40-57. (In Russ.)]

2. Гаврилюк В.П., Статина 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 = Medical Newsletter of Vyatka*, 2022, no. 1 (73), pp. 90-96. (In Russ.)]
3. Chakravarti A., Rusu D., Flamand N., Borgeat P., Poubelle P.E. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab. Invest.*, 2009, Vol. 89, pp. 1084-1099.
4. Davis R.E., Sharma S., Conceição J., Carneiro P., Novais F., Scott P., Sundar S., Bacellar O., Carvalho E.M., Wilson M.E. Phenotypic and functional characteristics of HLA-DR⁺ neutrophils in Brazilians with cutaneous leishmaniasis. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 3, pp. 739-749.
5. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, Vol. 28, no. 2, pp. 260-274.
6. Fanger N.A., Liu C., Guyre P.M., Wardwell K., O'Neil J., Guo T.L., Christian T.P., Mudzinski S.P., Gosselin E.J. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II-expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*, 1997, Vol. 89, pp. 4128-4135.
7. Grieshaber-Bouyer R., Nigrovic P.A. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 346. doi: 10.3389/fimmu.2019.00346.
8. Hernández-Caselles T., Martínez-Esparza M., Pérez-Oliva A.B., Quintanilla-Cecconi A.M., García-Alonso A., Álvarez-López D.M., García-Peñarrubia P. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 1, pp. 46-58.
9. Lin A., Loré K. Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1781. doi: 10.3389/fimmu.2017.01781.
10. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 10, pp. 1677-1689.
11. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Mitropanova M.N. Antigen presenting subset of CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children: Immunomodulating effects of immunotropic hexapeptide in an *in vitro* experimental system. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 899-906. doi: 10.15789/1563-0625-APS-2776.
12. Polak D., Bohle B. Neutrophils-typical atypical antigen presenting cells? *Immunol. Lett.*, 2022, Vol. 247, pp. 52-58.
13. Reinisch W., Lichtenberger C., Steger G., Tillinger W., Scheiner O., Gangl A., Maurer D., Willheim M. Donor dependent, interferon- γ induced HLA-DR expression on human neutrophils *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 133, no. 3, pp. 476-484.
14. Sandilands G.P., Mc Crae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*, 2006, Vol. 119, no. 4, pp. 562-571.
15. Veis D.J., Cassat J.E. Infectious osteomyelitis: marrying bone biology and microbiology to shed new light on a persistent clinical challenge. *J. Bone Miner. Res.*, 2021, Vol. 36, pp. 636-643.

Авторы:

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

Authors:

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 Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-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

Чичерев Е.А. — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста 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

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

Барова Н.К. — к.м.н., доцент, заведующая кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Professor of the 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

Chicherev E.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, 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

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

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 09.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 09.07.2023
Accepted 12.07.2023