

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ *IN VITRO* В МОДЕЛИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОИНФЕКЦИИ ФЕНОТИПА СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ АРГИНИЛ-АЛЬФА-АСПАРТИЛ-ЛИЗИЛ-ВАЛИЛ-ТИРОЗИЛ- АРГИНИНА

Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>, Павленко В.Н.<sup>1</sup>, Русинова Т.В.<sup>1</sup>,  
Ковалева С.В.<sup>1</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.** Одной из ключевых причин негативного полимикробного синергизма при коинфекциях является нарушение функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ). В этой связи актуальность приобретает разработка в системе *in vitro* экспериментальных моделей вирусно-бактериальных коинфекций, в которых возможно на молекулярном уровне выявить дефекты включения НГ в эффекторные процессы и оценить реорганизацию взаимосвязанных функционально-значимых рецепторов НГ под влиянием различных иммунотропных веществ. Понимание молекулярных механизмов работы той или иной молекулы, включая «молекулу» лекарственного препарата, обеспечивает безопасное его применение и делает его препаратом выбора. Функциональная активность НГ связана с поверхностными мембранными рецепторами CD64, CD32, CD16, CD11b, формирующими субпопуляции с различными фенотипами, активация которых приводит к сложным процессам элиминации патогена.

Цель исследования – в созданной *in vitro* экспериментальной модели вирусно-бактериальной коинфекции уточнить варианты трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и оценить возможность перепрограммирования их фенотипа под влиянием гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП).

Проведено исследование 39 образцов периферической крови (ПК) условно здоровых взрослых добровольцев (7 женщин, 6 мужчин) в возрасте от 21 до 32 лет. Сформировано 3 группы: группа сравнения 1 (интактные НГ); группа сравнения 2 – модель вирусно-бактериальной инфекции; группа

## Адрес для переписки:

Чудилова Галина Анатольевна  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
350061, Россия, г. Краснодар, ул. Благоева, 14, кв. 11.  
Тел.: 8 (918) 410-22-14.  
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

## Address for correspondence:

Chudilova Galina A.  
Kuban State Medical University  
350061, Russian Federation, Krasnodar, Blagoev str., 14,  
apt 11.  
Phone: 7 (918) 410-22-14.  
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

## Образец цитирования:

Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова, В.Н. Павленко,  
Т.В. Русинова, С.В. Ковалева «Экспериментальное  
перепрограммирование *in vitro* в модели  
вирусно-бактериальной коинфекции фенотипа  
субпопуляций CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ,  
CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ нейтрофильных  
гранулоцитов под влиянием аргинил-альфа-аспартил-  
лизил-валил-тирозил-аргинина» // Российский  
иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 4. С. 395-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-456-EIV

© Чудилова Г.А. и соавт., 2020

## For citation:

G.A. Chudilova, I.V. Nesterova, V.N. Pavlenko,  
T.V. Rusinova, S.V. Kovaleva "Experimental *in vitro*  
reprogramming of CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and  
CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophilic granulocytes by  
arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine in modelled  
virus-bacterial coinfection", Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 4,  
pp. 395-402.  
doi: 10.46235/1028-7221-456-EIV

DOI: 10.46235/1028-7221-456-EIV

исследования — оценка влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП). Для воспроизведения модели вирусно-бактериальной коинфекции образцы ПК инкубировали последовательно с ДцРНК ( $10^{-7}$ М) в течение 60 мин, далее с fMLP ( $10^{-7}$ М) в течение 60 мин  $37^{\circ}\text{C}$ . Для оценки влияния ГП образцы ПК после преинкубации с ДцРНК и fMLP инкубировали с ГП ( $10^{-6}$  г/л) в течение 60 мин  $37^{\circ}\text{C}$ . Проточной цитометрией (FC 500, Beckman Coulter, США) тестировалось количество НГ субпопуляций  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ ,  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$  и плотность экспрессии рецепторов (MFI) с использованием МКАТ (Beckman Coulter International S.A., Франция).

Экспериментально выявлена трансформация фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ ,  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$  в модели вирусно-бактериального процесса в виде усиления экспрессии всех изучаемых рецепторов. Получены неоднозначные результаты влияния ГП на трансформированный в системе *in vitro* в модели вирусно-бактериальной коинфекции фенотип субпопуляций  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ ,  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ , способствующие восстановлению адекватного ответа НГ.

*Ключевые слова:* нейтрофильные гранулоциты, эксперимент *in vitro*, субпопуляции, аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин, коинфекция, условно здоровые взрослые

## EXPERIMENTAL *IN VITRO* REPROGRAMMING OF $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$ AND $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$ NEUTROPHILIC GRANULOCYTES BY ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LYSYL-VALYL-TYROSYL-ARGININE IN MODELLED VIRUS-BACTERIAL COINFECTION

Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Nesterova I.V.<sup>a,b</sup>, Pavlenko V.N.<sup>a</sup>, Rusinova T.V.<sup>a</sup>, Kovaleva S.V.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** Disruption of neutrophilic granulocyte (NG) functioning underlies one of the key causes for negative polymicrobial synergism during virus-microbial co-infections. In connection with this, it is important to develop experimental models for viral-bacterial co-infections *in vitro*, which might allow to uncover NG involvement in effector events and assess reorganization of inter-connected functionally relevant NG receptors in response to various immunotropic agents. Understanding molecular mechanisms related to any molecule including drug molecules provides its safe use allowing them to become drug of choice. NG functional activity is associated with surface receptors CD64, CD32, CD16, CD11b, which are assigned to several NG subsets exhibiting distinct phenotypes, and their activation leads to complex processes of pathogen elimination. Study objective: to elucidate types of phenotype transition for NG subsets  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$  and  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$  and assess an opportunity for phenotype reprogramming exposed to hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine (HP) in experimental *in vitro* model of viral-bacterial co-infection. Materials and methods. We examined 39 samples of peripheral blood (PB) collected from healthy adult volunteers (7 women, 6 men) aged 21 to 32 years, subdivided into 3 groups: comparison group 1 (intact NG); comparison group 2 — model of viral-bacterial infection; Study group — to assess HP effects. Model of viral-bacterial co-infection was created by incubating PB samples sequentially with dsRNA ( $10^{-7}$ М) for 60 min followed by fMLP ( $10^{-7}$ М) for 60 min,  $37^{\circ}\text{C}$ . To assess HP effect, PC samples preincubated with dsRNA and fMLP were next exposed to HP ( $10^{-6}$  g/L) for 60 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . We analyzed percentage of  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$  and  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{NG}$  subsets as well as receptor expression density (MFI) by flow cytometry (FC 500, Beckman Coulter, USA) using MAbs (Beckman Coulter International SA, France). Results. Transformation of  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+$  and  $\text{CD64}^+\text{CD32}^+\text{CD16}^+\text{CD11b}^+\text{NG}$  subset phenotype was experimentally revealed in virus-bacterial model manifested as upregulated expression

of all receptors examined. Our data on HP effects ambiguously demonstrated phenotype transformation in CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG in *in vitro* viral – bacterial coinfection model contributing to recovery of proper NG response.

*Keywords: neutrophilic granulocytes, in vitro experiment, subpopulations, arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine, coinfection, healthy adults*

Исследование при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-415-230001p\_a.

## Введение

Проблема коинфицирования в современном мире признается одной из наиболее актуальных, поскольку к настоящему времени этой сочетанной патологией поражена шестая часть населения планеты [11]. Повышенная восприимчивость к бактериальной инфекции в первые дни острой вирусной инфекции приводит к более тяжелому течению заболеваний, которые не поддаются методам стандартной терапии, что является серьезной клинической проблемой [1, 8, 9]. Причины полимикробного синергизма до сих пор полностью не изучены, что затрудняет разработку эффективных профилактических и терапевтических вмешательств. Известно, что инфицированные вирусом клетки могут снижать врожденный иммунный ответ за счет изменения экспрессии антимикробных пептидов (дефенсинов), которые секретируются слизистой оболочкой дыхательных путей [5, 10]. Во время вирусных инфекций возникают каскады провоспалительных реакций, ведущих к усилению регуляции адгезионных белков, обнаруживаемых на эпителиальных клетках, что приводит к клеточной инвазии патогенных бактерий [6]. Продуцируемые вирусные компоненты, такие как нейраминидаза (NA), гликопротеин, разрушают инфицированные клетки, обнажая врожденные рецепторы распознающие бактериальные клетки, что способствует появлению бактериальных осложнений и, следовательно, возникновению вирусно-бактериальных коинфекций [4]. Вирусы могут влиять на иммунную систему, вызывая фагоцитарную дисфункцию нейтрофильных гранулоцитов (НГ), уменьшая окислительный взрыв и усиливая апоптоз НГ, что также способствует повышению восприимчивости к бактериальным инфекциям [8, 13]. С другой стороны, под влиянием вирусно-бактериальных коинфекций, на фоне гиперактивации НГ проявляются негативные свойства этих клеток, что может сопровождаться повреждением тканей и органов [12]. Уточнение механизмов иммунологического дисбаланса, ответственного за возникающий негативный синергизм вирусов и бактерий и, в первую очередь, особенностей дефектного функционирования НГ, в конечном

итоге может позволить создать новые иммунотерапевтические подходы не только для предотвращения формирования нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, но для более эффективного лечения вирусно-бактериальных коинфекций.

Антимикробная активность НГ связана с поверхностными мембранными рецепторами CD64, CD32, CD16, CD11b, формирующими определенные субпопуляции с различными фенотипами. Активация субпопуляций приводит к сложным процессам элиминации различных патогенов посредством фагоцитоза, экзоцитоза внутриклеточных гранул, продуцирования активных форм кислорода, высвобождения нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), хемотаксической миграции. Кроме того, различные субпопуляции НГ синтезируют и секретируют разнообразные хемокины, цитокины и другие молекулы, осуществляя регулирование как врожденной, так и адаптивной иммунной системы [2, 3, 7].

В этой связи особую актуальность приобретает разработка в системе *in vitro* экспериментальных моделей вирусно-бактериальных коинфекций, в которых стало бы возможным на молекулярном уровне выявить дефекты включения НГ в эффекторные процессы и оценить реорганизацию взаимосвязанных функционально-значимых рецепторов НГ под влиянием различных иммунотропных веществ.

**Цель исследования** – в созданной *in vitro* экспериментальной модели вирусно-бактериальной коинфекции уточнить варианты трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и оценить возможность перепрограммирования их фенотипа под влиянием иммунотропного гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина.

## Материалы и методы

Проведено исследование 39 образцов периферической крови (ПК) условно здоровых взрослых добровольцев (7 женщин, 6 мужчин) в возрасте от 21 до 32 лет. Сформировано 3 группы образцов ПК, по 13 образцов в каждой группе: группа сравнения 1 (интактные НГ); группа сравнения 2 – модель вирусно-бактериальной инфекции (ин-

кубация НГ с дцРНК, а далее с fMLP: вирусная и бактериальная нагрузка); группа исследования – оценка влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП) (преинкубация НГ с дцРНК и fMLP с последующей инкубацией с ГП)

Для моделирования вирусной инфекции в системе *in vitro* использована субстанция двухцепочечной РНК (дцРНК) – ключевой активатор врожденного иммунитета при вирусных инфекциях, является мощным индуктором интерферонов.

В целях воспроизведения условий бактериальной инфекции в системе *in vitro* нами был выбран N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), имеющий экзогенное (белок многих бактерий) и эндогенное происхождение (локализуется в митохондриях клеток человека). fMLP является одним из мощных хемотаксических факторов НГ, который связывается с гетеродимерными G-белками – рецепторами клеточной поверхности, активирует широкий спектр сигнальных путей, опосредуемых фосфатидинозитол-специфической фосфолипазой C (PLC), фосфолипазой D (PLD), фосфотидилинозитол-3-киназой (PI3K) и митоген-активированными протеинкиназами (МАРК) и индуцирует активность различных функций НГ, таких как фагоцитоз, хемотаксис, генерация активных форм кислорода и высвобождение микробицидных молекул из гранул НГ.

Для исследования был использован гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП), который является активным центром гормона тимуса тимопоэтина и обладает определенными иммунорегуляторными свойствами, а также способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений, восстанавливая баланс окислительно-антиокислительных реакций при инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Для воспроизведения ранее созданной нами экспериментальной модели вирусно-бактериальной инфекции образцы цельной крови условно здоровых лиц (группа сравнения 1) инкубировали последовательно с дцРНК (в конечной концентрации  $10^{-7}$ М) в течение 60 мин, далее с fMLP (в конечной концентрации  $10^{-7}$ М), в течение 60 мин, при температуре 37 °С.

Для оценки влияния ГП образцы ПК после преинкубации с дцРНК и fMLP инкубировали с ГП (в конечной концентрации  $10^{-6}$  г/л в течение 60 мин, при температуре 37 °С).

Методом множественной проточной цитометрии (FC 500, Beckman Coulter, США) тестировалось количество (в %) НГ функционально-значимых субпопуляций CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ,

CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и плотность экспрессии рецепторов по показателю интенсивности флуоресценции (MFI), с использованием конъюгатов МКАТ CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE, CD11b-PC5 (Beckman Coulter International S.A., Франция).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и 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

Анализ полученных данных продемонстрировал, что в образцах ПК НГ условно здоровых взрослых лиц (группа сравнения 1) в 96,1 (93,7-97,2) % представлены субпопуляцией CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и в 0,2 (0,1-1,9) % субпопуляцией CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ с разной плотностью экспрессии мембранных молекул. Так, в субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, дополнительно имеющей CD64 рецептор, выявлен более высокий уровень экспрессии CD16 – 30,4 (24,6-36), CD32 – 5,32 (4,9-6,3) и CD11b 67,2 (54,8-71,1) ( $p_{1,2,3} < 0,05$ ).

Преинкубация с дцРНК с последующим добавлением fMLP в группе сравнения 2 (модель вирусно-бактериальной коинфекции) позволила выявить эффекты их совместного стимулирующего влияния на уровни экспрессии поверхностных рецепторов обеих субпопуляции НГ. При этом показано и статистически значимое увеличение в 19,3 раза количества НГ активированной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ), что сопровождалось статистически значимым увеличением плотности всех экспрессируемых поверхностных мембранных рецепторов: CD64 (в 1,1 раза), CD16 (в 1,4 раза), CD32 (в 1,56 раза), CD11b (в 1,78 раза) ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ;  $p_3 < 0,05$ ;  $p_4 < 0,05$ ). Под влиянием дцРНК и fMLP количество НГ «сторожевой» субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b не менялось, но при этом выявлено статистически значимое повышение плотности экспрессии поверхностных мембранных молекул по MFI: CD16 (в 1,15 раза), CD32 (в 1,5 раза) и более значимое – CD11b (в 1,53 раза) ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ;  $p_3 < 0,05$ ) (табл. 1).

Оценка влияния ГП на трансформированный в модели вирусно-бактериальной коинфекции фенотип и количество НГ функционально-значимых субпопуляций CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ выявила определенные изменения. Количество НГ «сторожевой»

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ АРГИНИЛ-АЛЬФА-АСПАРТИЛ-ЛИЗИЛ-ВАЛИЛ-ТИРОЗИЛ-АРГИНИНА НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> И CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ ЛИЦ *IN VITRO*, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)**

TABLE 1. INFLUENCE OF ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LYSYL-VALYL-TYROSYL-ARGININ ON THE PHENOTYPE OF CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> AND CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> SUBSETS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN HEALTHY ADULTS *IN VITRO*, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Группы Groups	CD64 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD32 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>				
	НГ/NG, %	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
Группа сравнения 1 Comparison group 1	96,1 (93,7-97,2)	22,3 (18,3-24,9)	3,5 (3,09-4,28)	28,9 (19,5-37,9)	
Группа сравнения 2 ДцРНК + fMLP Comparison group 2 DsRNA + fMLP	94,7 (94,7-96,2)	25,5* (25,5-34,8)	5,2* (5,12-6,00)	73,2* (73,20-81,25)	
Группа исследования ДцРНК + fMLP + ГП Study group DsRNA + MLP + HP	93 (90,95-96,08)	28,05 (21,68-30,63)	6,7*# (6,1-6,3)	90,7*# (83,4-97,2)	
	CD64 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD32 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>				
	НГ/NG, %	MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения 1 Comparison group 1	0,2 (0,1-1,9)	1,9 (1,45-2,09)	30,4 (24,6-36,0)	5,32 (4,9-6,3)	67,2 (54,8-71,1)
Группа сравнения 2 ДцРНК + fMLP Comparison group 2 DsRNA + fMLP	3,85* (3,80-5,66)	2,1* (2,13-2,43)	40,7* (40,65-74,20)	8,3*# (8,25-10,30)	119,9* (119,0-166,0)
Группа исследования ДцРНК + fMLP + ГП Study group DsRNA + MLP + HP	2,98* (2,7-3,2)	2,92*# (2,83-3,67)	31,2* (21,9-66,7)	6,56# (6,25-8,14)	81,7# (61,4-111,0)

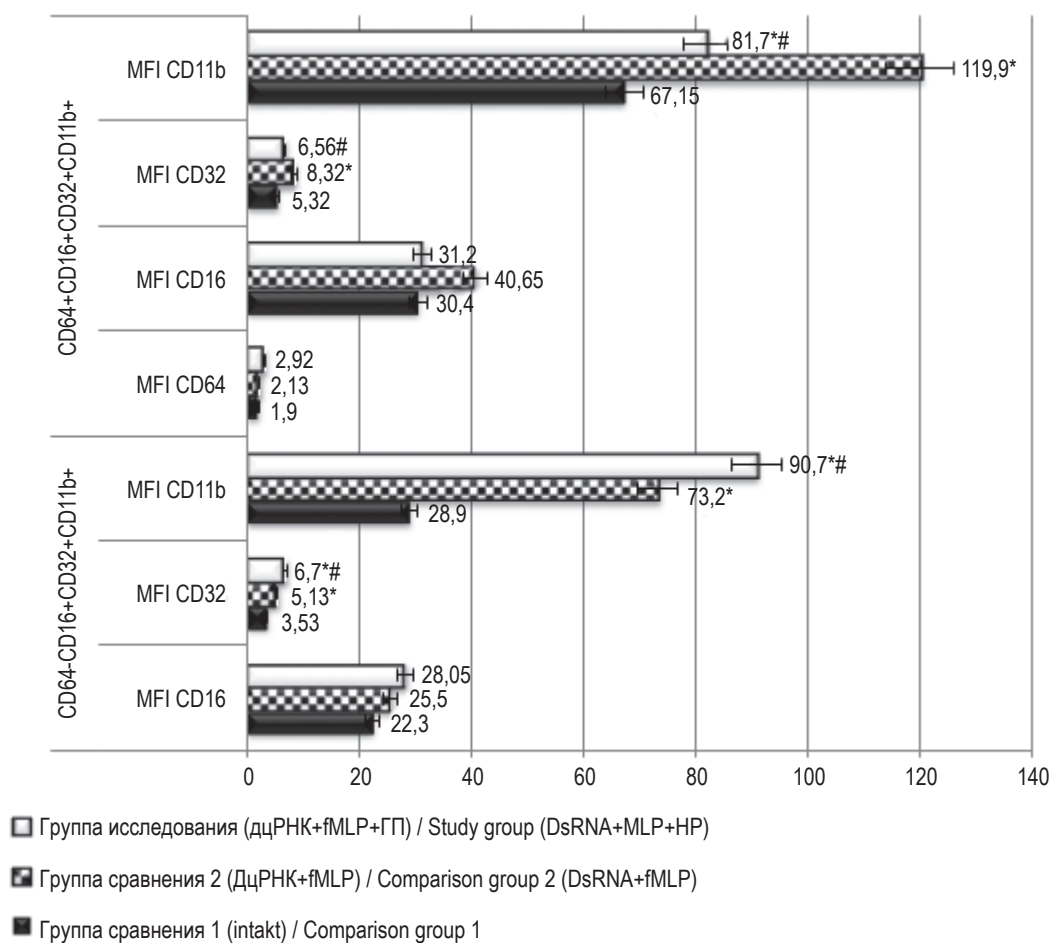
Примечание.\* – различия показателей по сравнению с интактными значениями НГ у условно здоровых взрослых (группа сравнения 1),  $p < 0,05$ ; # – различия показателей группы исследования от показателей группы сравнения 2,  $p < 0,05$ .

Note. \*, differences in indicators compared with intact values of NG in healthy adults (comparison group 1),  $p < 0.05$ ; #, differences in the indicators of the study group from the indicators of the comparison group 2,  $p < 0.05$

субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ под влиянием ГП по сравнению с их уровнем, выявленным в модели вирусно-бактериальной коинфекции, не изменилось ( $p > 0,05$ ). При этом отмечено изменение фенотипических характеристик субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ: статистически достоверно увеличилась плотность экспрессии мембранной молекулы CD32 в 1,3 раза и возросла плотность экспрессии по MFI активационного маркера – молекулы CD11b в 1,2 раза ( $p_1 < 0,05$ ;

$p_2 < 0,05$ ), выявлена тенденция к повышению экспрессии CD16 ( $p > 0,05$ ) (табл. 1, рис. 1).

Несколько иные изменения наблюдаются со стороны активированной субпопуляции НГ CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ по сравнению с характеристиками, выявленным в модели вирусно-бактериальной коинфекции. Количество НГ активированной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ под влиянием ГП по сравнению с их уровнем, выявленным в модели вирусно-бактериальной коинфекции, статистически достоверно уменьшилось в 1,3 раза



**Рисунок 1. Эффекты аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на фенотип субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>-</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ в модели вирусно-бактериальной коинфекции в системе *in vitro***

Примечание. \* – различия показателей по сравнению с интактными значениями НГ у условно здоровых взрослых (группа сравнения 1),  $p < 0,05$ ; # – различия показателей группы исследования от показателей группы сравнения 2,  $p < 0,05$ .

Figure 1. Effects of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine on the phenotype of a subset CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG and CD64<sup>-</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG in a viral-bacterial model co-infection *in vitro*

Note. \*, differences in indicators compared with intact values of NG in healthy adults (comparison group 1),  $p < 0.05$ ; #, differences in the indicators of the study group from the indicators of the comparison group 2,  $p < 0.05$ .

( $p < 0,05$ ). Однако при этом достоверно возросла плотность экспрессии поверхностной активационной молекулы CD64 в 1,3 раза по MFI ( $p < 0,05$ ) и статистически значимо снизились плотность экспрессии CD32 ( $p < 0,05$ ) и CD11b, соответственно, в 1,3 и в 1,5 раза ( $p_1 < 0,05$ ;  $p_2 < 0,05$ ), выявлена тенденция к снижению экспрессии CD16 ( $p > 0,05$ ) (табл. 1, рис. 1).

## Заключение

В модели вирусно-бактериальной коинфекции, полученной при последовательном воздействии сначала дцРНК, а затем fMLP выявлены профили фенотипических изменений как мажорной CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, так и минорной

CD64<sup>-</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ субпопуляции. Выявленные особенности приобретенного фенотипа субпопуляции CD64<sup>-</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, повышение уровня экспрессии CD16, CD32, CD11b позволяют заключить, что эта «сторожевая» субпопуляция приобрела более активный фенотип в модели вирусно-бактериальной коинфекции. В то же время следует отметить появление в модели вирусно-бактериальной инфекции значительно большего количества НГ активированной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ с более активным фенотипом всех экспрессируемых рецепторов по MFI, чем у условно здоровых субъектов группы сравнения – интактные НГ субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ. Появление молекулы CD64 на мембране НГ име-

ет прямую связь с активацией клеток бактериальным АГ, с последующей транслокацией данной молекулы из гранулярного аппарата клетки на поверхностную мембрану НГ.

Полученные в системе *in vitro* экспериментальные данные по влиянию ГП – аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина в модели вирусно-бактериальной коинфекции продемонстрировали неоднозначные влияния на субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и их фенотипические характеристики.

Так, ГП дополнительно активирует фенотип «сторожевой» субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ, которая была до этого преактивирована в модели вирусно-бактериальной коинфекции. Мы полагаем, что эта субпопуляция обладает определенным протективным эффектом и действие НГ этой «сторо-

жевой» субпопуляции с активированным фенотипом направлено на предотвращение развития вирусно-бактериальной инфекции.

Влияние ГП на субпопуляцию CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и ее фенотипические характеристики имеет совершенно иной характер. ГП значительно уменьшает количество НГ суперактивированной в модели вирусно-бактериальной коинфекции субпопуляции и статистически достоверно меняет ее активированный фенотип: снижает экспрессию активационного маркера CD11b, поверхностной мембранной молекулы CD32 при умеренной тенденции к снижению экспрессии CD16. С нашей точки зрения, таким образом проявляется модулирующий, сдерживающий активность эффект влияния ГП на количество и фенотип суперактивированной субпопуляции CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ.

## Список литературы / References

1. Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Вирусно-бактериальные коинфекции как глобальная проблема современной медицины // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2018. Т. 22, № 1. С. 29-42. [Balmasova I.P., Malova E.S., Sepiashvili R.I. Viral and bacterial coinfection as a global problem of modern medicine. *Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina = Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series: Medicine*, 2018, Vol. 22, no. 1, pp. 29-42. (In Russ.)]
2. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Русина Т.В., Евлевский А.А., Малиновская В.В. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. UK, USA, Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Lomtadze L.V., Kolesnikova N.V., Rusinova T.V., Evlevsky A.A., Malinovskaya V.V. Neutrophilic granulocytes: a reflection in the mirror of modern ideas]. UK, USA, Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 p
3. Чудилова Г.А., Нестерова И.В. Фенотипический профиль CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 1. С. 53-61. [Chudilova G.A., Nesterova I.V. Phenotypic profile subset CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophil granulocytes in healthy newborns, conditionally healthy children of different age groups and conditionally healthy adult individuals. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 1, pp. 53-61. (In Russ.)]
4. Alymova I.V., Portner A., Takimoto T., Boyd K.L., Babu Y.S., McCullers J.A. The novel parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX 2798 prevents lethal synergism between a paramyxovirus and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, Vol. 49, no. 1, pp. 398-405.
5. Bellinghausen C., Rohde G.G.U., Savelkoul P.H.M., Wouters E.F.M. Stassen Viral-bacterial interactions in the respiratory tract. *J. Gen. Virol.*, 2016, Vol. 97, no. 12, pp. 3089-3102.
6. Bosch A.A.T.M., Biesbroek G., Trzcinski K., Sanders E.A.M., Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, no. 1, e1003057. doi: 10.1371/journal.ppat.1003057.
7. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 6. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.
8. Brealey J.C., Sly P.D., Young P.R., Chappell K.J. Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2015, Vol. 362, no. 10, fmv062. doi: 10.1093/femsle/fmv062.
9. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Valar A.P., Koendetman L., Bem R.A., van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 176, pp. 100-106.
10. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 9, pp. 710-720.
11. Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A., Petchey O.L. The nature and consequences of coinfection in humans. *J. Infect.*, 2011, Vol. 63, no. 3, pp. 200-206.

12. Grunwell J.R., Giacalone V.D., Stephenson S., Margaroli C., Dobosh B.S., Brown M.R., Fitzpatrick A.M., Tirouvanziam R. Neutrophil dysfunction in the airways of children with acute respiratory failure due to lower respiratory tract viral and bacterial coinfections. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 2874. doi: 10.1038/s41598-019-39726-w12.

13. Meskill S.D., O'Bryant S.C. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2020, Vol. 22, no. 1, 3. doi: 10.1007/s11908-020-0711-8.

---

**Авторы:**

**Чудилова Г.А.** — к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Нестерова И.В.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и 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 ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

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

**Русинова Т.В.** — к.б.н., научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Ковалева С.В.** — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

**Authors:**

**Chudilova G.A.**, PhD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, 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 Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

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

**Rusinova T.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

**Kovaleva S.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation