

Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.¹, Чапурина В.Н.¹, Ковалева С.В.¹, Ломтатидзе Л.В.¹, Тараканов В.А.¹, Тетерин Ю.В.¹, Пирогова А.И.¹

Дифференцированность иммуномодулирующих эффектов аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина и глюкозаминилмурамилдипептида на эффекторные функции и фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в экспериментальной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 117198, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Возникновение нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, трудно поддающихся стандартной терапии, связано с всевозрастающей частотой проявлений инфекционно-воспалительных заболеваний ассоциированных с ко-инфицированием и антибиотикорезистентностью, что является серьезной клинической проблемой. Уточнение механизмов дефектного функционирования нейтрофильных гранулоцитов (НГ), ответственных за возникающий негативный синергизм вирусов и бактерий, является актуальным, а оценка возможности переориентирования функционального потенциала НГ под воздействием иммуотропных субстанций может позволить создать новые иммунотерапевтические подходы для более эффективного лечения вирусно-бактериальных ко-инфекций.

Цель исследования: в созданной нами ранее экспериментальной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции в системе *in vitro* оценить влияние аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина и глюкозаминилмурамилдипептида на эффекторные функции НГ и фенотип функционально значимых субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ.

Материал и методы. Проведено исследование 42 образцов периферической крови (ПК) условно-здоровых взрослых лиц. Последовательной инкубацией ПК с дцРНК, fMLP воспроизведена модель вирусно-бактериальной ко-инфекции. На модели ко-инфекции в системе *in vitro* проведена сравнительная оценка влияния гексапептида

аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП) и глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на фенотип и количество функционально-значимых субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ; на активность NADPH-оксидаз НГ в NBT-тесте спонтанном и стимулированном *Staphylococcus aureus* (штамм 209); на фагоцитарную активность НГ в реакции со *Staphylococcus aureus* (штамм 209) с тестированием %ФАН – процент активно-фагоцитирующих НГ, с определением % неактивных НГ (%Н), % сформировавшихся NET и % НГ в апоптозе.

Результаты. При сравнительном изучении двух иммуностропных субстанций ГП и ГМДП в экспериментальной модели вирусно-бактериальной инфекции *in vitro* мы получили разные по степени выраженности позитивные эффекты, позволяющие восстанавливать и/или активировать дефектную эффекторную функцию НГ, позитивно влиять на негативно трансформированный *in vitro* фенотип и количество субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ. Некоторые сходства и различия в интенсивности проявлений иммуномодулирующих эффектов ГП и ГМДП, по-видимому, обусловлены особенностями их связывания с разными рецепторами НГ, что активирует различные сигнальные пути, направленные на активацию эффекторных и регуляторных функций НГ.

Заключение. Выявленные эффекты могут быть основой для разработки рациональных дифференцированных иммунотерапевтических стратегий, ориентированных на восстановление нормального функционирования НГ в зависимости от глубины выявленных нарушений.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты; модель ко-инфекции; субпопуляции; фенотип; глюкозаминилмурамилдипептид; аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин.

Для корреспонденции

Нестерова Ирина Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы

народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Москва,
Российская Федерация

E-mail: inesteroval@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

Информация для цитирования:

Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Тараканов В.А., Тетерин Ю.В., Пирогова А.И. Дифференцированность иммуномодулирующих эффектов аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина и глюкозаминилмурамилдипептида на эффекторные функции и фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в экспериментальной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции. Иммунология. 2022; 43 (1): 15–26. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-1-015-026>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-415-230001 р_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов.

Нестерова И.В. – разработка концепции исследования, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания в текст. Чудилова Г.А., Тараканов В.А., Ковалева С.В. – разработка дизайна исследования, анализ данных и литературы, написание текста. Чапурина В.Н., Ломтатидзе Л.В. – проведение исследования и статистического анализа, оформление статьи. Тетерин Ю.В., Пирогова А.И. – сбор и анализ данных, оценка функциональной активности клеток.

Nesterova I.V.^{1,2}, Chudilova G.A.¹, Chapurina V.N.¹, Kovaleva S.V.¹, Lomtaticidze L.V.¹, Tarakanov V.A.¹, Teterin Yu.V.¹, Pirogova A.I.¹

Differentiation of immunomodulatory effects of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine and glucosaminylmuramyl dipeptide on effector functions and phenotype of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes in an experimental model of viral-bacterial co-infection

¹Federal state budget educational institution for higher professional education Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russian Federation

²Peoples' Friendship University of Russia of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. The emergence of atypical infectious and inflammatory diseases, that are difficult to respond to standard therapy, is associated with the increasing frequency of manifestations of the combined pathology of co-infection and antibiotic resistance, which is a serious clinical problem. Clarification of the mechanisms of defective neutrophilic granulocytes (NG) functioning responsible for the emerging negative synergism of viruses and bacteria is urgent, and the assessment of the possibility of reorienting the functional potential of NG under the influence of immunotropic substances can allow creating new immunotherapeutic approaches for more effective treatment of viral-bacterial co-infections.

Aim of the study: in the previously created experimental model of viral-bacterial co-infection in the in vitro system to assess the effect of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine and glucosaminylmuramyl dipeptide on the effector functions of neutrophilic granulocytes (NG) and the phenotype of functionally significant subpopulations CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG.

Material and methods. A study of 42 samples of peripheral blood (PB) of apparently healthy adults was carried out. By sequential incubation of PB with dsRNA, fMLP the experimental model of viral-bacterial co-infection was reproduced. A comparative assessment of the effect of hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine (HP) and glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP) on the phenotype and number of functionally significant subpopulations CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG was carried out in the co-infections experimental model in an in vitro system; on activity NADPH oxidases of NG in NBT-test spontaneous and stimulated by *Staphylococcus aureus* (strain 209); on phagocytic function with *Staphylococcus aureus* (strain 209): % FAN - % of active phagocytic NG, % inactive NG (%ING), % NET - %NG formed NET, %NG in apoptosis.

Results. In a comparative study of two immunotropic substances HP and GMDP in an experimental model of viral-bacterial infection in vitro, we obtained positive effects of different severity, allowing to restore and/or activate the defective phagocytic function of NG,

to positively influence the phenotype negatively transformed in vitro and the number of CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG subpopulations. Some similarities and differences in the intensity of manifestations of the immunomodulatory effects of HP and GMDP are apparently due to the peculiarities of their binding to different NG receptors, which activates various signaling pathways aimed at activating the effector and regulatory functions of NG.

Conclusion. The revealed effects can be the basis for the development of rational differentiated immunotherapeutic strategies focused on restoring the normal functioning of NG, depending on the depth of the revealed disorders.

Key words: neutrophilic granulocytes; co-infection model; subpopulations; phenotype; glucosaminylmuramyl dipeptide; arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine.

For correspondence

Nesterova Irina Vadimovna ^{a, b}, MD, PhD, Professor, Chief Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation; Professor of the Department of Allergology and Immunology Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute RUDN University Ministry of Education and Science of Russia; Moscow, Russian Federation

E-mail: inesterova1@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

For citation:

Nesterova I. V., Chudilova G. A., Chapurina V. N., Kovaleva S. V., Lomtatidze L. V., Tarakanov V. A., Teterin Yu. V., Pirogova A.I. Differentiation of immunomodulatory effects of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine and glucosaminylmuramyl dipeptide on effector functions and phenotype of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes in an experimental model of viral-bacterial co-infection. *Immunologiya*. 2022; 43 (1): 15–26. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-1-015-026>. (in Russian)

Funding. The reported study was funded by RFBR and the Administration of the Krasnodar Territory according to the research project No. 19-415-230001 r_a.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

Authors contribution.

Nesterova I. V. – development of a research concept, critical revision with the introduction of valuable intellectual content into the text. Chudilova G.A., Tarakanov V.A., Kovaleva S.V. – development of research design, data and literature analysis, text writing. Chapurina V.N., Lomtadidze L.V. – research and statistical analysis, article design. Teterin Yu.V., Pirogova A.I. – collection and analysis of data, assessment of the functional activity of cells.

Введение

Всевозрастающая частота проявлений сочетанной патологии, полимикробный синергизм ко-инфицирования являются трудно разрешимыми клиническими проблемами, так как стандартные терапевтические подходы не позволяют контролировать их течение, приводя к развитию антибиотикорезистентности и нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний [1 - 4]. В настоящее время известно, что острая вирусная инфекция часто осложняется обострением хронической бактериальной инфекцией или сопровождается присоединением бактериальной инфекции на фоне возникающей нейтропении, на возникновение которой влияют продуцируемые вирусами супрессирующие факторы. Нейтропения и нарушение эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ), таких как дефектность фагоцитарной функции и нарушение продукции активных форм кислорода (АФК), снижение продукции антимикробных пептидов, усиление апоптоза НГ, способствуют присоединению бактериальных инфекций. Этими обстоятельствами лишь частично можно объяснить возникновение нарушений функционирования иммунной системы и ассоциированных с ними нетипично-протекающих вирусно-бактериальных ко-инфекций [6 - 9]. Кроме того, высокотоксичные повреждающие факторы некоторых вирусов (нейраминидаза, гликопротеин и т.д.), разрушая инфицированные клетки, снижая экспрессию паттерн - рецепторов, распознающих бактерии, способствуют развитию бактериальных осложнений [10]. Показано, что дисфункция НГ, вызванная вирусом гриппа А (influenza A virus - IAV), способствует повышению восприимчивости к вторичной пневмококковой инфекции [11], а истощение НГ во время сочетанной инфекции IAV/*S.pneumoniae* увеличивает смертность.[12]. НГ могут по-разному реагировать на микробные стимулы: дегрануляцией, в результате чего НГ секретируют медиаторы и протеолитические ферменты (ММР, МРО и NE), которые хранятся в цитоплазматических гранулах, продукцией АФК внутриклеточно или внеклеточно, фагоцитозом патогенов,

ограничивая их распространение, в то время как фагоцитоз клеточного дебриса и апоптотического материала может способствовать разрешению воспаления [12, 13]. НГ также могут ограничивать распространение микробов, образуя экстрацеллюлярные сети (NET) [13-17]. Наконец доказано, что НГ могут иметь прямые и косвенные взаимодействия с другими клетками иммунной системы, такими как альвеолярные макрофаги, дендритные клетки (DC) и Т-клетки [16]. Современные представления о многофункциональности НГ связывают с наличием различных субпопуляций НГ [18-21]. От фенотипических особенностей НГ – плотности экспрессируемых рецепторов на поверхностной мембране, в частности CD16, CD11b, CD32, CD64, зависит способность клеток определять степень и тип инициируемых ими эффекторных программ, оказывающих супрессорное или гиперэргическое повреждающие действие и тем самым влияющих на течение и исход инфекционного процесса [13,18, 21]. Нацеливание терапевтических стратегий на различные субпопуляции НГ может облегчить таргетное ингибирование или восстановление провоспалительных функций НГ или, действуя на нейтрофильный компартмент рецепторов, способствовать их активации, возможно, даже истощению этих клеток без ущерба для организма хозяина [22]. В этой связи уточнение механизмов неэффективной работы НГ при полимикробном синергизме вирусов и бактерий является актуальным, а оценка возможности переориентировать функциональный потенциал НГ под воздействием иммунотропных субстанций в конечном итоге может служить отправной точкой для разработки новых эффективных лечебных алгоритмов с включением иммунотропной терапии при вирусно-бактериальных ко-инфекциях.

Цель исследования: в созданной нами ранее экспериментальной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции в системе *in vitro* оценить влияние аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина и глюкозаминилмурамилдипептида на эффекторные функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и фенотип функционально значимых субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ.

Материал и методы

Проведено исследование 56 образцов периферической крови (ПК) условно-здоровых взрослых (7 женщин, 7 мужчин) в возрасте от 21 до 32 лет. У всех участников было получено информированное согласие на участие в исследовании и забор крови согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Группы исследования: Группа сравнения 1 (интактные НГ, n=14); Группа сравнения 2 (n=14) – модель вирусно-бактериальной ко-инфекции (последовательная инкубация НГ с дцРНК, с fMLP; Группа исследования 1 (n=14) – оценка влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП) в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции; Группа исследования 2 (n=14) – оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции.

Дизайн исследования. Экспериментальное исследование проводилось в 3 этапа. На I этапе была воспроизведена созданная нами ранее модель вирусно - бактериальной ко-инфекции [23]. С этой целью к образцам цельной ПК добавляли дцРНК (10^{-7} М, Т 37°C, в течение 60 мин.) и далее fMLP (10^{-7} М, Т 37°C в течение 15 мин.).

Для создания модели вирусно-бактериальной ко-инфекции в системе *in vitro* использованы субстанции: дцРНК, являющейся активатором врожденного иммунитета при вирусных инфекциях, индуктором интерферонов; fMLP, белок многих бактерий, хемотаксический фактор НГ, который связывается с поверхностными мембранными рецепторами индуцируя широкий спектр сигнальных путей и активность различных функций НГ, таких как хемотаксис, фагоцитоз, высвобождение микробицидных молекул из гранул НГ (антителозависимую клеточную цитотоксичность – АЗКЦ, NETos) и генерацию АФК.

На II этапе оценивалось влияние ГП и ГМДП на НГ в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции: образцы ПК после преинкубации инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут с ГП или с ГМДП, при этом конечная концентрация ГП составляла 10^{-6} г/л, конечная концентрация ГМДП составляла 10^{-6} г/л.

ГП обладает иммунорегуляторными свойствами, способен восстанавливать баланс окислительно-антиокислительных реакций, инактивировать свободно-радикальные и перекисные соединения. ГП связывается с рецепторами на клетках иммунной системы.

ГМДП – пептидогликан клеточной стенки бактерий, стимулирует функциональную (бактерицидную, цитотоксическую) активность макро- и микрофагоцитов, усиливает презентацию антигенов, пролиферацию лимфоцитов, продукцию специфических антител, поляризует Th1/Th2-лимфоциты в сторону Th1-ответа.

Проточной цитометрией (FC 500, «Beckman Coulter», США) определяли процент НГ субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ и плотность экспрессии рецепторов – средняя интенсивность флуоресценции (MFI). Использованы конъюгаты МКАТ («Beckman Coulter International S.A.», Франция) CD16-ECD, CD32-PE, CD11b-PC5, CD64-FITC. Субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ оснащены Fcγ-рецепторами и рецептором к компоненту С3 комплемента. Активация и взаимодействие этих рецепторов в зависимости от их плотности экспрессии может запускать различные эффекторные свойства НГ: фагоцитоз, экзоцитоз внутриклеточных гранул, продуцирование АФК, АЗКЦ, образование NETs, выделение хемокинов и цитокинов [13, 26]. Статистически значимую разницу значений MFI обозначали терминами bright (яркий), mid (средний), dim (низкий), для выявления особенностей фенотипа субпопуляций и динамики экспрессии каждой мембранной молекулы.

На III этапе во всех экспериментальных группах (после проведения преинкубации с дцРНК и fMLP (группа сравнения 2); дцРНК, fMLP и дополнительном воздействии ГП (группа исследования 1); дцРНК, fMLP и дополнительном воздействии ГМДП группа исследования 2) и группе сравнения 1 оценивали влияние иммуностропных субстанций на микробицидную NADPH-зависимую функцию НГ; оценивали фагоцитарную – эффекторную функцию НГ: захват НГ бактериального антигена - *Staphylococcus aureus* (музейный штамм 209), образование NET, апоптоз НГ.

Активность NADPH-оксидазы НГ оценивалась в спонтанном (NBTсп) и стимулированном (NBTст) NBT-тесте. В NBTст. в качестве индуктора использовали взвесь *Staphylococcus aureus* (штамм №209) в разведении 1×10^6 микробных тел/ мл физ. раствора. Оценивали средний цитохимический индекс (СЦИсп и СЦИст), количество формазан позитивных клеток (%ФПКст, %ФПКсп), коэффициент мобилизации (КМ) – соотношение %ФПКст/%ФПКсп. Также для оценки функционирования НГ по отношению к *Staphylococcus aureus* (штамм № 209) использовали показатели: %ФАН (процент активно-фагоцитирующих НГ); %Н (неактивных НГ); количество НГ, образовавших NET; клеток, входящих в апоптоз.

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 (Q1;Q3). Статистически значимые различия определяли при $p < 0,05$.

Результаты

В образцах ПК НГ группы сравнения 1 в 96,11 (93,74; 97,22)% случаев были представлены субпопуляцией $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и лишь в 0,21 (0,14; 1,92)% субпопуляцией $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ. Для преобладающей субпопуляции был характерен фенотип $CD64^+CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{dim}$, а для субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ, имеющей дополнительно CD64 рецептор, с более высоким уровнем экспрессии CD16 ($p < 0,05$), CD32 ($p < 0,05$) и CD11b ($p < 0,05$) и фенотипом $CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{mid}CD11b^{mid}$ НГ (Табл. 1).

Таблица 1. Влияние гексапептида и глюкозаминилмурамилдипептида на количество и фенотип субпопуляций $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ нейтрофильных гранулоцитов в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции (Me(Q1;Q2))

Группы	$CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$				
	НГ,%	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b	
Группа сравнения 1	96,11 (93,74; 97,22)	22,3 dim (18,3; 24,9)	3,5 dim (3,1; 4,2)	28,9 dim (19,5; 37,9)	
Группа сравнения 2 ДцРНК+ fMLP	94,70 (94,70; 96,21)	25,5* mid (25,5; 34,8)	5,2* bright (5,1; 6,0)	73,2* mid (73,2; 81,2)	
Группа исследования 1 ДцРНК+fMLP+ГП	93,0 (90,93; 96,00)	28,0 mid (21,7; 30,6)	6,7*# bright (6,1; 6,3)	90,7*# bright (83,4; 97,2)	
Группа исследования 2 ДцРНК+fMLP+ГМДП	95,34 (91,33; 96,81)	21,6^ dim (19,0; 23,0)	3,0^ dim (2,4; 4,6)	32,8^ dim (20,1; 47,2)	
	$CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$				
	НГ/NG,%	MFI CD64	MFI CD16	MFI CD32	MFI CD11b
Группа сравнения 1	0,21 (0,14; 1,92)	1,9 dim (1,4; 2,0)	30,4 mid (24,6; 36,0)	5,3 mid (4,9; 6,3)	67,2 mid (54,8; 71,1)
Группа сравнения 2 ДцРНК+ fMLP	3,82* (3,80; 5,66)	2,1* mid (2,1; 2,4)	40,7* bright (40,65; 74,2)	8,3*# bright (8,2; 10,3)	119,9* bright (119,0; 166,0)
Группа исследования 1 ДцРНК+fMLP+ГП	2,90*# (2,70; 3,21)	2,9*# bright (2,8; 3,7)	31,2* mid (21,9; 66,7)	6,56# mid (6,2; 8,1)	81,7# mid (61,4; 111,0)
Группа исследования 2 ДцРНК+fMLP+ГМДП	2,50*^ (2,11; 3,12)	2,4* mid (2,2; 2,7)	23,1^ dim (20,0; 28,3)	7,2 mid (5,2; 9,4)	68,7^ mid (51,0; 84,3)

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

При моделировании вирусно-бактериальной ко-инфекции путем последовательной инкубации с дцРНК и fMLP (группа сравнения 2) выявлены стимулирующие эффекты их совместного влияния на плотность экспрессии поверхностных мембранных рецепторов обеих субпопуляции НГ по отношению к показателям, определяемым в интактных образцах группы сравнения 1. Количество НГ $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^-$ НГ не менялось под действием дцРНК и fMLP, но при этом было выявлено повышение MFI молекул: CD16 (в 1,15 раза), CD32 (в 1,5 раза) и более значимое – CD11b (в 1,53 раза) ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$), с трансформацией фенотипа – $CD64^+CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{mid}$ НГ. Увеличение в 19 раз количества НГ активированной субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ ($p < 0,05$) сопровождалось с повышением MFI всех изучаемых рецепторов: CD64 (в 1,1 раза), CD16 (в 1,4 раза), CD32 (в 1,6 раза), CD11b (в 1,8 раза) ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$; $p_4 < 0,05$) – трансформацией фенотипа в $CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{bright}CD11b^{bright}$ НГ (Табл. 1, Рис 1).

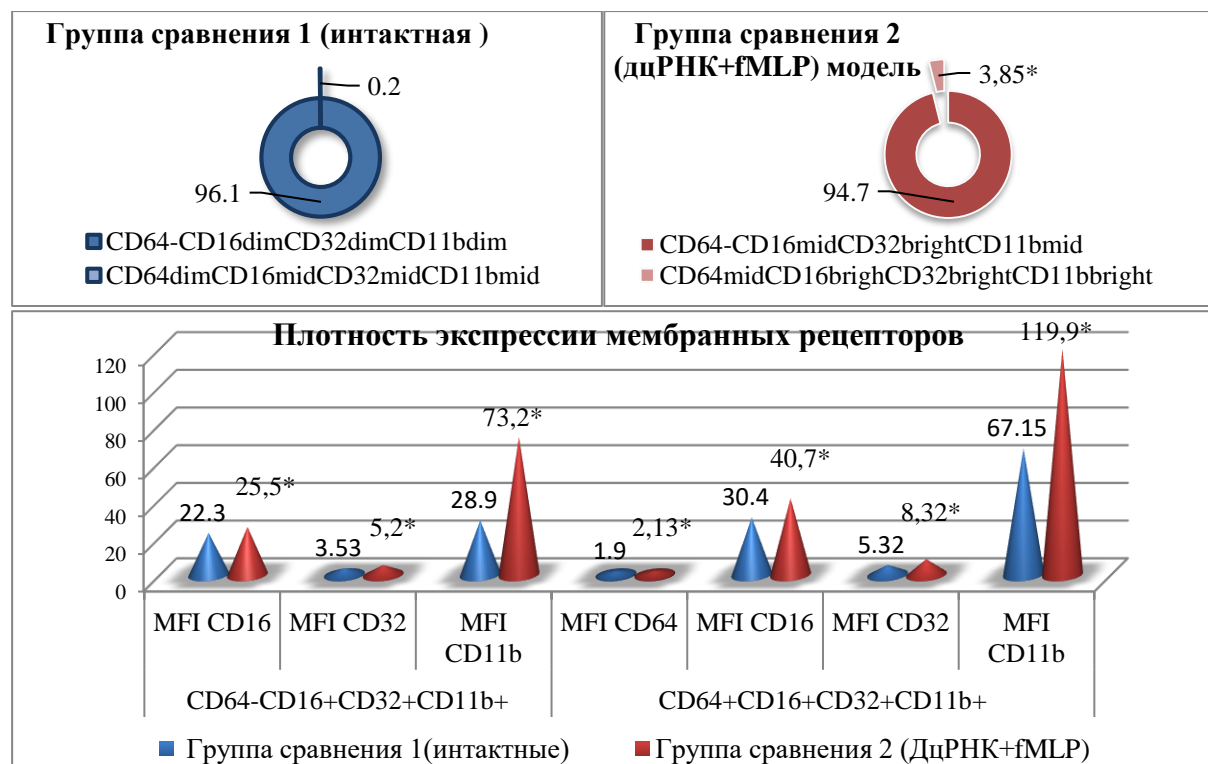


Рис. 1. Трансформация субпопуляций CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и их фенотипа в модели вирусно - бактериальной ко-инфекции в системе *in vitro*

*Примечание:** - различия показателей по сравнению с интактными значениями НГ у условно-здоровых взрослых (группа сравнения 1), $p < 0,05$.

При оценке эффектов ГП на трансформированный фенотип и количество НГ в экспериментальной модели ко-инфекции установлены тенденции снижения CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ ($p > 0,05$) с увеличением MFI CD32 в 1,3 раза ($p < 0,05$), активационного маркера – молекулы CD11b в 1,2 раза ($p < 0,05$) и MFI CD16 ($p > 0,05$) – CD64⁻CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ. При этом наблюдается и снижение в 1,3 раза %CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ с изменением фенотипических характеристик: достоверно возросла MFI CD64 в 1,3 раза ($p < 0,05$) и снизились MFI CD32 и CD11b, соответственно в 1,3 и в 1,5 раза ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$), а также MFI CD16 ($p > 0,05$) – CD64^{bright}CD16^{mid}CD32^{mid}CD11b^{mid}НГ (Табл.1; Рис.2).

Под влиянием ГМДП по сравнению с эффектами ГП в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции, показано, что ГМДП в системе *in vitro* также не влияет на количество НГ субпопуляции CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, которая составляет 95,34 (91,3; 96,8)% ($p > 0,05$). Но под влиянием ГМДП иначе изменяется фенотип CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ: значимо снижается плотность экспрессии всех поверхностных мембранных рецепторов; в 1,2 раза CD16 ($p < 0,05$), в 2,2 раза CD32 ($p < 0,05$) и в 2,8 раз CD11b ($p < 0,05$) практически до показателей группы сравнения 1 приобретая фенотип CD64⁻CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{dim} (Табл.1; Рис.2).

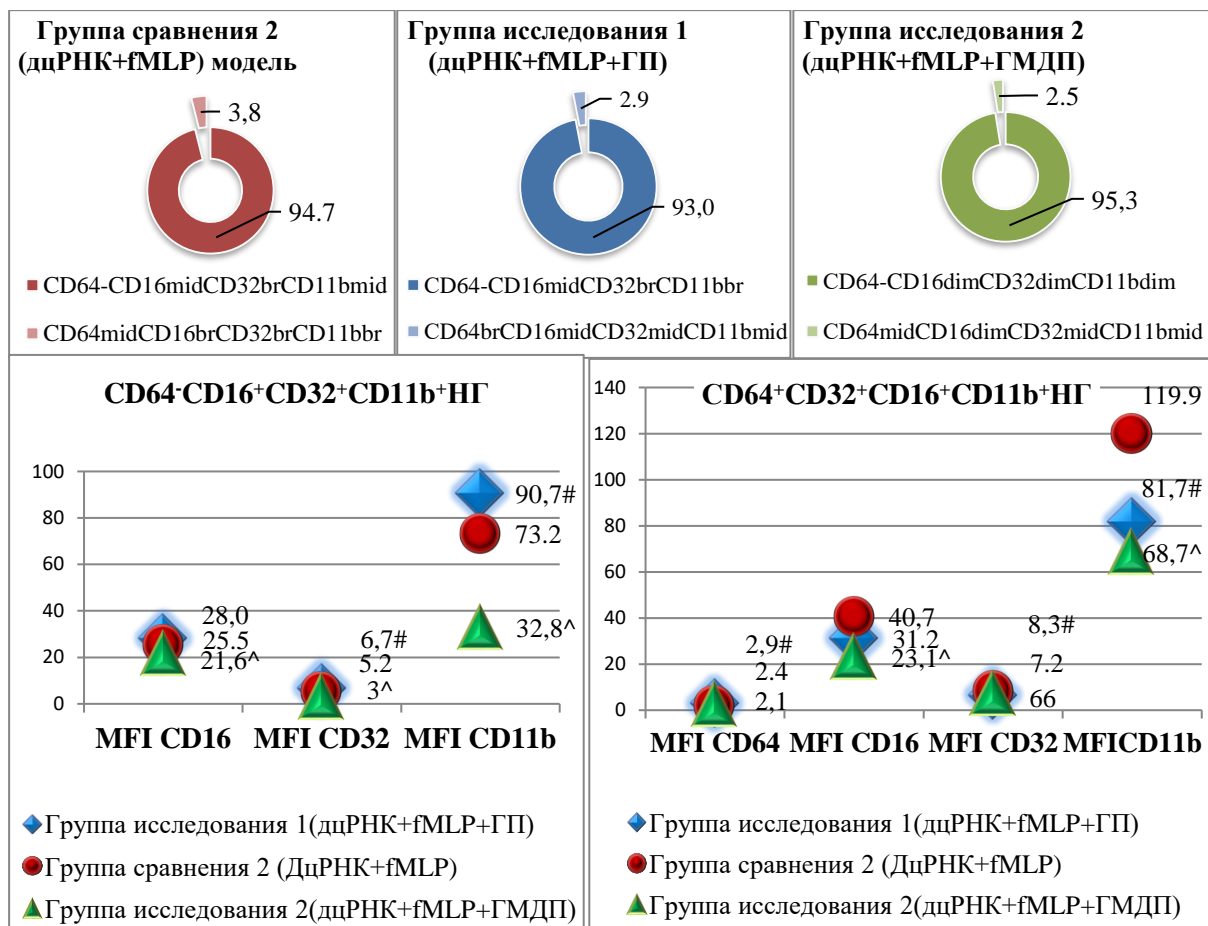


Рис. 2. Эффекты гексапептида и глюкозаминилмурамилдипептида на фенотип CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции in vitro

Примечание: #- различия показателей группы исследования 1 от показателей группы сравнения 2, $p < 0,05$, ^ - различия показателей группы исследования 2 от показателей группы сравнения 2.

Количество НГ активированной субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, выявленное в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции под влиянием ГМДП уменьшилось в 1,5 раза ($p < 0,05$), однако оставалось выше показателя группы сравнения 1. Кроме того, наблюдалась ремодуляция фенотипа в CD64^{mid}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{mid}НГ за счет снижения в 1,8 раз MFI CD16 ($p < 0,05$) и MFI CD11b ($p < 0,05$) до показателей контрольной группы сравнения 1, тенденции уменьшения MFI CD11 ($p > 0,05$), при этом уровень CD 64 не менялся (Табл.1; Рис.2).

В воспроизведенной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции получено значительное увеличение спонтанной ($p < 0,05$) и индуцированной ($p < 0,05$) активности NADPH-оксидаз под влиянием дцРНК и fMLP, соответственно уровень спонтанной

активности по СЦИ увеличился до 0,5 (0,36; 0,78) против 0,19 (0,17; 0,23) ($p < 0,05$), а %ФПК до 19,0(16,0; 22,0)% против 3,45 (1,5; 3,5)% у условно здоровых лиц ($p < 0,05$). В NBT стимулированном тесте уровень активности увеличился по СЦИ до 0,60 (0,41;0,80) против 0,30 (0,28;0,34) ($p < 0,05$), а по %ФПК до 11,5 (8,25; 21,0)% против 3,45 (1,0; 5,25)% у условно здоровых лиц ($p < 0,05$). КМ характеризовался выраженной, но не достоверной, тенденцией к снижению (Табл. 2).

При оценке фагоцитарной функции НГ в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции выявлено, что при времени нагрузки НГ *Staphylococcus aureus* - 120 мин, отмечается снижение количества активно работающих НГ - %ФАН до 40,5 (22,8; 43,3) % против 50,5 (47,3;56,3)% у лиц группы сравнения 1 ($p < 0,05$), наблюдалось увеличение в 3 раза количества НГ, вошедших в апоптоз до 12,5 (10,25; 14,25)% против 4,0 (1,75; 6,50) в группе сравнения ($p < 0,05$). У 65% НГ, находившихся в апоптозе, в цитоплазме определялось большое количество *Staphylococcus aureus* (от 6 до 12 и более микробов) (Рис 3). Количество НГ, формирующих NET, было в пределах показателей группы сравнения 1 ($p > 0,05$) (Табл. 2, Рис.3).

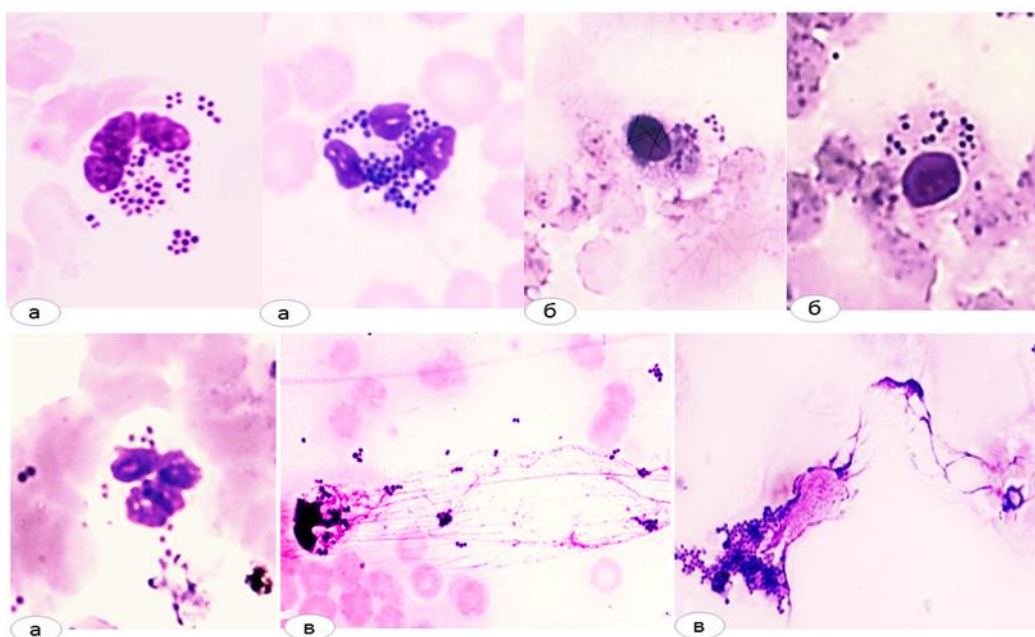


Рис. 3. Фагоцитоз, апоптоз, нетоз нейтрофильных гранулоцитов в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции в системе in vitro

Примечание: а - фагоцитоз, б- апоптоз НГ, в- NET НГ, индукция *Staphylococcus aureus*

Выявлены различные эффекты влияния ГП и ГМДП на эффекторную функцию НГ в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции.

При оценке эффектов ГП в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции на активность NADPH-оксидаз выявлено лишь снижение в спонтанном NBT-тесте %ФПКсп с 19,0(16,0; 22,0)% до 11,0 (4,0;13,5)% ($p<0,05$), однако, при этом показатели оставались выше уровня условно-здоровых лиц ($p<0,05$). Оценивая влияние ГП на фагоцитарную функцию НГ в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции, было показано восстановление количества активно фагоцитирующих НГ до уровня группы сравнения 1 – %ФАН повысился с 40,5(22,8; 43,3) % до 61,0(55,6; 72,0) % ($p<0,05$) (Табл. 2). Выявлено значительное уменьшение количества неактивных НГ – до 22,5.0 (15,25; 26,75)%, что ниже, чем в группе сравнения 1 и в экспериментальной модели ко-инфекции ($p_1>0,05$; $p_2>0,05$). Наблюдалось снижение в 2 раза количества НГ, вошедших в апоптоз до 5,5 (2,75; 11,0)%, что не отличалось от показателей группы сравнения 1 – 4,0 (1,75; 6,50)% ($p>0,05$) и было ниже, чем в экспериментальной модели ко-инфекции ($p<0,05$). Количество нетингующих НГ составило 2,0 (1,0; 3,5)%, оставаясь на уровне показателей группы сравнения 1 и модели вирусно-бактериальной ко-инфекции ($p_1>0,05$; $p_2>0,05$) (Табл. 2)

Показано, что при оценке изменений спонтанной и индуцированной активности NADPH-оксидаз НГ под влиянием ГМДП в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции установлено лишь достоверное снижение %ФПК в спонтанном NBT-тесте с 19,0(16,0; 22,0)% до 8,0(4,5;10,5)% ($p<0,05$), не достигающее уровня у условно-здоровых лиц ($p<0,05$). Под влиянием ГМДП в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции было показано повышение количества %ФАН в 2 раза с 40,5 (22,8; 43,3) % до 80,0 (70,5; 86,5)% ($p<0,05$), что значительно превысило уровень, наблюдаемый у лиц группы сравнения 1 - 50,5 (47,3;56,3)% ($p<0,05$) и в модели вирусно-бактериальной инфекции 40,5(22,8; 43,3) ($p<0,05$). Имело место уменьшение количества неактивных НГ – до 14,0 (8,75; 19,0), что было значительно ниже, чем в группе сравнения 1 и в группе сравнения 2 ко-инфекции ($p_1>0,05$; $p_2>0,05$). Наблюдалось снижение в 3,6 раза количества НГ, вошедших в апоптоз, - до 3,5(2,0; 7,0)% против 12,5(10,25; 14,25)% в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции, при этом количество НГ в апоптозе не отличалось от показателей группы сравнения 1 – 4,0(1,75; 6,50) ($p>0,05$). Количество НГ, формирующих NET, оставалось на уровне показателей группы сравнения 1 и модели вирусно-бактериальной ко-инфекции ($p_1>0,05$; $p_2>0,05$) (Табл.2).

Таблица 2. Влияние гексапептида и глюкозаминилмурамилдипептида на NADPH-зависимый микробицидный потенциал, фагоцитарную активность, формирование

NETs, апоптоз нейтрофильных гранулоцитов в системе *in vitro* в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции (Me(Q1;Q2))

		Интактные НГ	ДцРНК+fMLP	ДцРНК+fMLP+ГП	ДцРНК+fMLP+ГМДП
NBТст.	СЦИсп	0,19 (0,17; 0,23)	0,5* (0,36; 0,78)	0,47* (0,27; 0,59)	0,39* (0,31; 0,46)
	%ФПКсп	3,45 (1,5; 3,5)	19,0* (16,0; 22,0)	11,0*^ (4,0; 13,5)	8,0*^ (4,5; 10,5)
NBТст.	СЦИст	0,30 (0,28; 0,35)	0,60* (0,41; 0,80)	0,70* (0,40; 1,0)	0,36^ (0,18; 0,39)
	%ФПКст	3,45 (1,0; 5,25)	11,5 (8,25; 21,0)	13 (5,0; 29,5)	14 (8,0; 21,0)
KM		1,83 (1,0; 1,92)	0,96 (0,41; 2,38)	1,92 (0,43; 5,39)	1,02 (0,63; 1,46)
%ФАН		50,5 (47,3; 56,3)	40,5* (22,8; 43,3)	61,0^ (55,6; 72,0)	80,0*^ (70,5; 86,5)
% Неактивных НГ		42,7 (38,25; 56,5)	43,5 (36,7; 56,5)	22,5*^ (15,25; 26,75)	14,0*^ (8,75; 19,0)
% Апоптоза		4,0 (1,75; 6,5)	12,5* (10,25; 14,25)	5,5 (2,75; 11,0)	3,5^ (2,0; 7,0)
%NET		2,0 (1,0; 3,75)	2,5 (1,0; 4,8)	2 (1,0; 3,5)	3,5 (2,0; 5,25)

Обсуждение

В модели вирусно-бактериальной ко-инфекции, полученной при последовательном воздействии дцРНК, fMLP на ПК условно-здоровых взрослых лиц, выявлены профили количественных и фенотипических изменений CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ субпопуляций. Установлено, что субпопуляция CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ приобрела более активный фенотип CD64⁺CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{mid}НГ, с повышенным уровнем экспрессии CD11b, CD16, CD32, в ответ на смоделированную вирусно-бактериальную нагрузку, что свидетельствует о том, что НГ здоровых субъектов быстро индуцируют сборку мембранного клеточного аппарата, за счет предсинтезированных и хранящихся в гранулах рецепторов, необходимого для выполнения эффекторных функций [24].

Следует отметить появление в модели вирусно-бактериальной инфекции активированной субпопуляции CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ в большем количестве и с более высоким MFI экспрессируемых рецепторов, чем у условно-здоровых субъектов – субпопуляции CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ. Экспрессия молекулы CD64 на мембране НГ имеет прямую связь с активацией клеток бактериальным АГ с транслокацией данной молекулы из гранулярного аппарата клетки на поверхностную

мембрану НГ. Кроме того, рецепторы Fc, такие как CD64, могут связывать опсонизированные патогены и иммунные комплексы [25, 26]. Следовательно, возможно, что позже, во время первичной инфекции или во время повторной инфекции, когда присутствуют вирус-специфические IgG, активированные НГ могут увеличивать фагоцитоз связанных с IgG вирусных частиц и играть более выраженную роль в клиренсе вируса.

Экспериментальные данные по влиянию ГП и ГМДП в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции в системе *in vitro* продемонстрировали неоднозначные эффекты на субпопуляции $CD64^-CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$ и $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$.

Установлено, что ГП дополнительно активизирует фенотип «сторожевой» субпопуляции – $CD64^-CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ$, которая была до этого преактивирована в модели вирусно-бактериальной ко-инфекции. По нашему мнению, эта субпопуляция обладает протективным эффектом, направленным на предотвращение развития вирусно-бактериальной инфекции. Однако, влияние ГП на субпопуляцию $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$ имеет совершенно иной характер: значимо уменьшает количество данной субпопуляции НГ, активированной в созданной модели ко-инфекции, и меняет ее фенотип на $CD64^{bright}CD16^{mid}CD32^{mid}CD11b^{mid}НГ$. С нашей точки зрения, именно таким образом проявляется модулирующий эффект влияния ГП, сдерживающий активность гиперактивированной субпопуляции $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$.

ГМДП в экспериментальной модели вирусно-бактериального процесса демонстрирует иммуномодулирующие свойства. ГМДП, также как и ГП, не влияет на количество НГ субпопуляции $CD64^-CD16^+CD32^+CD11b^+$. В то же время ГМДП приводит к снижению плотности экспрессии всех поверхностных мембранных рецепторов - $CD64^-CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ$ до показателей группы сравнения 1. На фоне снижения активированной субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$ под влиянием ГМДП наблюдалось изменение фенотипа в $CD64^{mid}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{mid}НГ$.

Некоторые сходства и различия в интенсивности проявлений иммуномодулирующих эффектов ГП и ГМДП, по-видимому, обусловлены особенностями их связывания с разными рецепторами НГ, что активизирует различные механизмы сигналинга, направленного в первую очередь на активацию эффекторных и регуляторных функций НГ. Так, ГП, являясь синтетическим аналогом активного

центра полипептидного гормона тимуса тимопозтина, связывается с двумя видами рецепторов НГ. Тимопэтин оказывает физиологические эффекты воздействия на иммунную систему, связываясь с ацетилхолиновым рецептором [27]. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (NACHR) представляют собой пентамерные катионные каналы, экспрессируемые клетками нейронального типа. NACHR также обнаруживаются на трех типах лейкоцитарных клеток: нейтрофильных, базофильных, эозинофильных гранулоцитах [28]. В экспериментальных исследованиях на мышах показано, что воздействие на NACHR может модулировать функциональную активность НГ [29]. Кроме того, получены убедительные данные, свидетельствующие о прямом связывании Тимопентина (TP5) - пентапептид, – синтетический аналог активного центра тимопозтина, с молекулами ГКГС II типа – HLA-DR. Использование в эксперименте флуоресцентно меченого TP5, продемонстрировало прямое связывание TP5 с HLA-DR, а специфичность связывания подтверждена ингибированием немеченым TP5. Молекулярный анализ дополнил это открытие об изменении сайта связывания в бороздке HLA-DR и наличии валина (Val), выступающего как якоря 1 типа, необходимого для связывания TP5 с HLA-DR [30].

Принимая во внимание, что Гексапептид - Имунофан: Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine и Пентапептид - Тимопентин (TP-5): Arginyl-Lysyl-Aspartyl-Valyl-Tyrosyl позиционируются разработчиками и исследователями, как синтетические аналоги активного центра тимопозтина, данные, приведенные выше, свидетельствуют о существовании двух путей рецепторного связывания ГП и НГ: связывание с HLA-DR и с NACHR. При этом ГП демонстрирует «мягкие» иммуномодулирующие эффекты на НГ, восстанавливая их эффекторную фагоцитарную функцию и позитивно трансформируя количество и фенотип функционально значимых субпопуляций.

ГМДП связывается с совершенно иными рецепторами, в частности, с цитозольным внутриклеточным рецептором NOD2. NOD2 реагирует на молекулярную сигнатуру бактериального пептидогликана, называемого мурамилдипептидом (MDP) присутствующего как в грамположительных, так и в грамотрицательных бактериях. NOD2 напрямую связывается с MDP, что приводит к развитию иммунного ответа через активацию NF-κB [31].

В настоящее время раскрыты более сложные иммунные пути влияния мурамилдипептидов. Они, как различные фрагменты пептидогликанов, активируют разные транскрипционные программы и сигнальные пути: PG STAT1, IRF5, cJun и p65,

NF-κB, которые индуцируют экспрессию различных генов, частности генов про- и противовоспалительных цитокинов, интерферонов и т.д. [32].

Принимая во внимание, что ГМДП относится к мурамилдипептидам и реализует свои иммуномодулирующие свойства относительно НГ иным, чем ГП путем, - через активацию цитозольного внутриклеточного рецептора NOD2, эффекты его влияния выражены более сильно, чем влияния ГП. При этом ГМДП демонстрирует более выраженные по интенсивности иммуномодулирующие эффекты влияния на дефектные функции НГ и на фенотип их субпопуляций, восстанавливая их эффекторную фагоцитарную функцию и позитивно трансформируя количество и фенотип функционально значимых субпопуляций.

Заключение

Таким образом, в результате сравнительного изучения двух иммуотропных субстанций гексапептида и глюкозаминлмурамилдипептида в экспериментальной модели вирусно-бактериальной ко-инфекции *in vitro* получены разные по степени выраженности позитивные эффекты, позволяющие восстанавливать и/или активировать дефектную фагоцитарную функцию НГ, позитивно влиять на негативно трансформированный фенотип и количество субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, ориентируясь на выявленные дефекты.

Учитывая, что изучаемые субстанции являются активными компонентами российских лекарственных препаратов, разрешенных к использованию у детей и взрослых субъектов, выявленные позитивные иммуномодулирующие эффекты могут быть основой для разработки рациональных дифференцированных иммунотерапевтических стратегий, направленных на восстановление нормального функционирования НГ в зависимости от глубины выявленных нарушений: коррекцию эффекторных функций и фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ при различных вирусно-бактериальных ко-инфекциях, что должно способствовать оптимизации лечения и преодолению антибиотикорезистентности.

Литература

1. Балмасова И.П., Малова Е.С., Ефратова Е.П. ВИЧ-инфекция и проблема коинфицирования ВИЧ/ВГС. Российский иммунологический журнал. 2019; 13(2-1):144-146. DOI: 10.31857/S102872210006430-8.

2. Brealey J.C., Sly P.D., Young P.R., Chappell K.J.. Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood. *FEMS Microbiology Letters*. 2015; 362 (10): fnv062. DOI:10.1093/femsle/fnv062.
3. 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; 176: 100-6. DOI: 10.1016/j.clim.2016.12.012.
4. Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A., Petchey O.L. The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infect*. 2011; 63 (3): 200-6. DOI: 10.1016/j.jinf.2011.06.005.
5. Bellinghausen C., Rohde G.G.U., Savelkoul P.H.M., Wouters E.F.M., Stassen F.R.M. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract. *J Gen Virol*. 2016; 97 (12): 3089-3102. DOI: 10.1099/jgv.0.000627.
6. Кренив И.А., Берлов М.Н., Умнякова Е.С. Антимикробные белки и пептиды нейтрофильных гранулоцитов как модуляторы системы комплемента. *Иммунология*. 2021; 42 (4): 426-433. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-426-433
7. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (9): 710–20. DOI: 10.1038/nri1180.
8. 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; 9: 2874. DOI: 10.1038/s41598-019-39726-w.
9. Meskill, S.D., O’Bryant, S.C. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Current Infectious Disease Reports*. 2020; 22 (3): 2-8. DOI: 10.1007/s11908-020-0711-8.
10. 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; 49 (1): 398–405. DOI: 10.1128/AAC.49.1.398-405.2005.
11. McNamee L.A., Harmsen A.G. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2006; 74: 6707–6721. DOI: 10.1128/IAI.00789-06.
12. Ellis G.T., Davidson S., Crotta S., Branzk N., Papayannopoulos V., Wack A. TRAIL + monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase

- susceptibility to influenza - *Streptococcus pneumoniae* coinfection. *EMBO Rep.* 2015; 16: 1203–1218. DOI: 10.15252/embr.201540473.
13. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Ломтатидзе Л.В. Колесникова Н.В., Русинова Т.В., Евглевский А.А., Малиновская В.В. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. Capricorn Publishing, UK, USA, Moscow, 2018. 338 с. ISBN: 978-0-9774757-8-0.
 14. Warnatsc A., Tsourouktsoglou T.-D., Branzk N., Wang Q., Reincke S., Herbst S., Gutierrez M., Papayannopoulos V. Reactive oxygen species localization programs inflammation to clear microbes of different size. *Immunity.* 2017; 46 (3): 421–432 DOI: 10.1016/j.immuni.2017.02.013.
 15. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014; 15: 1017–1025. DOI: 10.1038/ni.2987.
 16. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013; 210 (7): 1283–1299. DOI: 10.1084/jem.20122220.
 17. Castanheira F.V.S., Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood.* 2019; 133 (20): 2178–2185. DOI: 10.1182/blood-2018-11-844530.
 18. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw.* 2017; 17 (5): 298-306. DOI: 10.4110/in.2017.17.5.298.
 19. Christoffersson G., Phillipson M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res.* 2018; 371 (3): 415-423. DOI: 10.1007/s00441-017-2780-z.
 20. Hellebrekers P., Vrisekoop N., Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur J Clin Invest.* 2018; 48(2):e12943. DOI: 10.1111/eci.12943.
 21. Чудилова Г.А., Нестерова И.В. Фенотипический профиль CD64-CD16+CD32+CD11b+, CD64+CD16+CD32+CD11b+ субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов. *Российский иммунологический журнал.* 2019; 13 (1): 53-61. DOI: 10.31857/S102872210005021-8.
 22. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol.* 2018; 103: 829–838. DOI: 10.1002/JLB.3RI0917-361R.
 23. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Yutskevich Y.A., Barova N.K., Tarakanov V.A. Phenotype remodeling in neutrophilic granulocyte subsets

- CD64-CD32+CD16+CD11B+NG, CD64+CD32+CD16+CD11B+NG in de novo experimental model of viral-bacterial infection in vitro. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(1):101-110. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ROT-1517>
24. El-Benna J., Dang P.M.-C., Gougerot-Pocidallo M.-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008; 30: 279–289. DOI: 10.1007/s00281-008-0118-3.
 25. Wang Y., Jönsson F. Expression, role, and regulation of neutrophil Fcγ receptors. *Front Immunol*. 2019; 10: 1958. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01958.
 26. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (6):10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.
 27. Venkatasubramanian K., Audhya T., Goldstein G. Binding of thymopoietin to the acetylcholine receptor. *P N A S*. 1986; 83 (10): 3171-3174. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3171>.
 28. Mulcahy M.J., Lester H.A. Granulocytes as models for human protein maker identification following nicotine exposure. *J Neurochem*. 2017; 142 (2): 151–161. DOI: 10.1111/jnc.14010.
 29. Serov D., Tikhonova I., Safronova V., Astashev M. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. *Cell Biol Int*. 2021; 45 (7):1533-1545. DOI: 10.1002/cbin.11593.
 30. Liu Z., Zheng X., Wang J., Wang E. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules. *PLoS One*. 2007; 2 (12): e1348. DOI: 10.1371/journal.pone.0001348.
 31. Lauro M.L., D'Ambrosio E. A., Bahnson B.J., Grimes C.L. The molecular recognition of muramyl dipeptide occurs in the leucine-rich repeat domain of Nod2. *ACS Infect Dis*. 2017; 14; 3 (4): 264–270. DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00154.
 32. Bersch K.L., DeMeester K.E., Zagani R., Chen S., Wodzanowski K.A., Liu S., Mashayekh S., Reinecker H.-C., Grimes C.L. Bacterial peptidoglycan fragments differentially regulate innate immune signaling. *ACS Cent Sci*. 2021; 7 (4): 688–696. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00200.

References

1. Balmasova I.P., Malova E.S., Efratova E.P. HIV infection and HIV/HCV co-infection problem. *Russian journal of immunology*. 2019; 13(2-1):144-146. DOI: 10.31857/S102872210006430-8. (in Russian).

2. Brealey J.C., Sly P.D., Young P.R., Chappell K.J.. Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood. *FEMS Microbiology Letters*. 2015; 362 (10): fnv062. DOI: [10.1093/femsle/fnv062](https://doi.org/10.1093/femsle/fnv062).
3. 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; 176: 100-6. DOI: [10.1016/j.clim.2016.12.012](https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.12.012).
4. Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A., Petchey O.L. The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infect*. 2011; 63 (3): 200-6. DOI: [10.1016/j.jinf.2011.06.005](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.06.005).
5. Bellinghausen C., Rohde G.G.U., Savelkoul P.H.M., Wouters E.F.M., Stassen F.R.M. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract. *J Gen Virol*. 2016; 97 (12): 3089-3102. DOI: [10.1099/jgv.0.000627](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000627).
6. Krenev I.A., Berlov M.N., Umnyakova E.S. Antimicrobial proteins and peptides of neutrophilic granulocytes as modulators of the complement system. *Immunologiya*. 2021; 42 (4): 426-433. DOI: [10.33029/0206-4952-2021-42-4-426-433](https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-4-426-433). (in Russian).
7. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (9): 710–20. DOI: [10.1038/nri1180](https://doi.org/10.1038/nri1180).
8. 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; 9: 2874. DOI: [10.1038/s41598-019-39726-w](https://doi.org/10.1038/s41598-019-39726-w).
9. Meskill, S.D., O’Bryant, S.C. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Current Infectious Disease Reports*. 2020; 22 (3): 2-8. DOI: [10.1007/s11908-020-0711-8](https://doi.org/10.1007/s11908-020-0711-8).
10. 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; 49 (1): 398–405. DOI: [10.1128/AAC.49.1.398-405.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.398-405.2005).
11. McNamee L.A., Harmsen A.G. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2006; 74: 6707–6721. DOI: [10.1128/IAI.00789-06](https://doi.org/10.1128/IAI.00789-06).
12. Ellis G.T., Davidson S., Crotta S., Branzk N., Papayannopoulos V., Wack A. TRAIL + monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase

- susceptibility to influenza - *Streptococcus pneumoniae* coinfection. EMBO Rep. 2015; 16: 1203–1218. DOI: [10.15252/embr.201540473](https://doi.org/10.15252/embr.201540473).
13. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Rusinova T.V., Evglevskij A.A., Malinovskaya V.V. Neutrophilic granulocytes: reflection in the mirror of modern conceptions. Capricorn Publishing, UK, USA, Moscow, 2018. 338 c. ISBN: 978-0-9774757-8-0. (in Russian).
 14. Warnatsch A., Tzourouktoglou T.-D., Branzk N., Wang Q., Reincke S., Herbst S., Gutierrez M., Papayannopoulos V. Reactive oxygen species localization programs inflammation to clear microbes of different size. Immunity. 2017; 46 (3): 421–432 DOI: [10.1016/j.immuni.2017.02.013](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.013).
 15. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nat Immunol. 2014; 15: 1017–1025. DOI: [10.1038/ni.2987](https://doi.org/10.1038/ni.2987).
 16. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. J Exp Med. 2013; 210 (7): 1283–1299. DOI: [10.1084/jem.20122220](https://doi.org/10.1084/jem.20122220).
 17. Castanheira F.V.S., Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. Blood. 2019; 133 (20): 2178–2185. DOI: [10.1182/blood-2018-11-844530](https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530).
 18. Hong C.W. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. Immune Netw. 2017; 17 (5): 298-306. DOI: [10.4110/in.2017.17.5.298](https://doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298).
 19. Christofferson G., Phillipson M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? Cell Tissue Res. 2018; 371 (3): 415-423. DOI: [10.1007/s00441-017-2780-z](https://doi.org/10.1007/s00441-017-2780-z).
 20. Hellebrekers P., Vrisekoop N., Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. Eur J Clin Invest. 2018; 48(2):e12943. DOI: [10.1111/eci.12943](https://doi.org/10.1111/eci.12943).
 21. Chudilova G.A., Nesterova I.V. Phenotypic profile of CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ subpopulations of neutrophilic granulocytes in healthy newborns, conventionally healthy children of various age groups and conventionally healthy adults. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2019; 13 (1): 53-61. DOI: [10.31857/S102872210005021-8](https://doi.org/10.31857/S102872210005021-8). (in Russian)
 22. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fide subsets or polarization states? J Leukoc Biol. 2018; 103: 829–838. DOI: [10.1002/JLB.3RI0917-361R](https://doi.org/10.1002/JLB.3RI0917-361R).
 23. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Rusinova T.V., Pavlenko V.N., Yutskevich Y.A., Barova N.K., Tarakanov V.A. Phenotype remodeling in neutrophilic granulocyte subsets

- CD64-CD32+CD16+CD11B+NG, CD64+CD32+CD16+CD11B+NG in de novo experimental model of viral-bacterial infection in vitro. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(1):101-110. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ROT-1517>.
24. El-Benna J., Dang P.M.-C., Gougerot-Pocidallo M.-A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008; 30: 279–289. DOI: 10.1007/s00281-008-0118-3.
 25. Wang Y., Jönsson F. Expression, role, and regulation of neutrophil Fcγ receptors. *Front Immunol*. 2019; 10: 1958. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01958.
 26. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (6):10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.
 27. Venkatasubramanian K., Audhya T., Goldstein G. Binding of thymopoietin to the acetylcholine receptor. *P N A S*. 1986; 83 (10): 3171-3174. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3171>.
 28. Mulcahy M.J., Lester H.A. Granulocytes as models for human protein marker identification following nicotine exposure. *J Neurochem*. 2017; 142 (2): 151–161. DOI: 10.1111/jnc.14010.
 29. Serov D., Tikhonova I., Safronova V., Astashev M. Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression. *Cell Biol Int*. 2021; 45 (7):1533-1545. DOI: 10.1002/cbin.11593.
 30. Liu Z., Zheng X., Wang J., Wang E. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules. *PLoS One*. 2007; 2 (12): e1348. DOI: 10.1371/journal.pone.0001348.
 31. Lauro M.L., D'Ambrosio E. A., Bahnson B.J., Grimes C.L. The molecular recognition of muramyl dipeptide occurs in the leucine-rich repeat domain of Nod2. *ACS Infect Dis*. 2017; 14; 3 (4): 264–270. DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00154.
 32. Bersch K.L., DeMeester K.E., Zagani R., Chen S., Wodzanowski K.A., Liu S., Mashayekh S., Reinecker H.-C., Grimes C.L. Bacterial peptidoglycan fragments differentially regulate innate immune signaling. *ACS Cent Sci*. 2021; 7 (4): 688–696. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00200.

Сведения об авторах

Нестерова Ирина Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация; профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация

E-mail: inesterova1@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

Чудилова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: chudilova2015@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0001-8005-9325>

Чапурина Валерия Николаевна – аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: pavlenkoevi2016@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-1912-2038>

Ковалева Светлана Валентиновна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: 3483335@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-9604-5806>

Ломтатидзе Людмила Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: lomtaticidze@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-7041-7106>

Тараканов Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: inesteroval@yandex.r

<http://orcid.org/0000-0001-8654-1454>

Тетерин Юрий Валерьевич – аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: zhuk.zhukovitch@yandex.ru

Пирогова Анна Ивановна, студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

E-mail: AnP1998@yandex.ru

Information about authors

Irina V. Nesterova – MD, PhD, Prof., Chief Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation; Professor of the

Department of Allergology and Immunology Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute, RUDN University Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russian Federation

E-mail: inesteroval@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-5339-4504>

Galina A. Chudilova – D.Sc. in Biology, associate professor, head of the department of clinical and experimental immunology and molecular biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: chudilova2015@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0001-8005-9325>

Valeriya N. Chapurina – Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: pavlenkoevi2016@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-1912-2038>

Svetlana V. Kovaleva – PhD (Medical Sciences), senior researcher of the department of clinical and experimental immunology and molecular biology of the Central Scientific Research Laboratory, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation,

E-mail: 3483335@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-9604-5806>

Lyudmila V. Lomtadze – PhD in Biology, senior researcher of the department of clinical and experimental immunology and molecular biology of the Central Scientific Research Laboratory, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: llomtadze@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-7041-7106>

Viktor A. Tarakanov – MD, PhD, Prof., Head of the Department of Surgical Diseases of Children, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: inesteroval@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0001-8654-1454>

Yuri V. Teterin – Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: zhuk.zhukovitch@yandex.ru

Anna I. Pirogova, 6th year student of the Faculty of Medicine FSBI HPE «KubSMU» MOH Russia, Krasnodar, Russian Federation

E-mail: AnP1998@yandex.ru