

# АМБИВАЛЕНТНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩУЮ СУБПОПУЛЯЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ГНОЙНО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ *IN VITRO*

Нестерова И.В.<sup>1,2</sup>, Чудилова Г.А.<sup>1</sup>, Тетерин Ю.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 имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

**Резюме.** Нейтрофильные гранулоциты (НГ) функционируют как регуляторы иммунного ответа. Одним из механизмов является экспрессия НГ молекул HLA-DR и представление антигена Т-клеткам. У детей с острым гематогенным остеомиелитом (ОГО), в патогенезе которого ведущая роль принадлежит дисфункции НГ, обнаружена антигенпрезентирующая активированная субпопуляция НГ CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. В этой связи возможность влиять на экспрессию поверхностных рецепторов, включая HLA-DR, иницирующими сигналами, для коррекции их функций представляет интерес. Цель исследования – оценить возможность модулирования фенотипа субпопуляций CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов под влиянием гексапептида (ГП) и глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) при остром гематогенном остеомиелите у детей в эксперименте *in vitro*.

Исследована периферическая кровь (ПК) 28 детей с ОГО 8-15 лет – группа исследования; 13 условно здоровых детей 8-15 лет – группа сравнения. Для оценки влияния ПК детей с ОГО культивировали с ГП (10<sup>-6</sup> г/л, 60 мин, 37 °С) – группа исследования 1 и с ГМДП (10<sup>-6</sup> г/л, 60 мин, 37 °С) – группа исследования 2. Тестировалось количество НГ субпопуляций CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, плотность экспрессии рецепторов (MFI), фагоцитарная активность НГ (FC 500 Beckman Coulter, США) до и после культивирования с пептидами.

У детей с ОГО регистрируется субпопуляция НГ CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> – 30,2 (16,4-34,9) %, с MFI HLA-DR 3,5 (3,3-4,2). Под влиянием ГП выявлено снижение количества НГ-АПК и MFI HLA-DR до 1,7 (1,6-2,2) (p<sub>1,2</sub> > 0,05) за счет связывания ГП с HLA-DR (p > 0,05). Под влиянием ГМДП отмечается значимое повышение MFI CD66b и MFI CD33 рецепторов (p<sub>1,2</sub> < 0,05) в обеих субпопуляциях, отмечается повышение MFI HLA-DR (p > 0,05) на субпопуляции НГ-АПК. Моду-

## Адрес для переписки:

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

## Address for correspondence:

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

## Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, Ю.В. Тетерин  
«Амбивалентность влияния иммунорегуляторных пептидов на антигенпрезентирующую субпопуляцию нейтрофильных гранулоцитов при гнойно-воспалительных заболеваниях *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 2. С. 287-294.  
doi: 10.46235/1028-7221-17026-AIV

© Нестерова И.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, Yu.V. Teterin “Ambivalent *in vitro* effect of immunoregulatory peptides on antigen-presenting subsets of neutrophil granulocytes in purulent inflammatory diseases”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 2, pp. 287-294.  
doi: 10.46235/1028-7221-17026-AIV

© Nesterova I.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.46235/1028-7221-17026-AIV

лирующие эффекты ГП и ГМДП на фенотип субпопуляций НГ CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> содействуют восстановлению фагоцитарной функции НГ.

Детекция в ПК детей с ОГО НГ «долгоживущей» активированной субпопуляции со свойствами АПК, представляющими АГ Т-лимфоцитам – CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, оставляет нерешенный вопрос, будет ли такая трансформация способствовать или замедлять прогрессирование гнойно-воспалительного процесса. Выявленные различные эффекты иммунотропных пептидов в *in vitro*, демонстрируют возможность модулировать фенотип субпопуляции НГ-АПК, способствуя восстановлению эффекторных функции НГ.

*Ключевые слова:* нейтрофильные гранулоциты, острый гематогенный остеомиелит, дети, антигенпрезентирующая субпопуляция, гексапептид, глюкозаминилмурамилдипептид

## AMBIVALENT *IN VITRO* EFFECT OF IMMUNOREGULATORY PEPTIDES ON ANTIGEN-PRESENTING SUBSETS OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN PURULENT INFLAMMATORY DISEASES

Nesterova I.V.<sup>a, b</sup>, Chudilova G.A.<sup>a</sup>, Teterin Yu.V.<sup>a</sup>

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

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

**Abstract.** Neutrophilic granulocytes (NG) are functioning as regulators of the immune response. Expression of NG molecules HLA-DR and presentation of antigen to T cells is one of their regulatory mechanisms. The NG dysfunction plays a great role in pathogenesis of acute hematogenous osteomyelitis (AHO) in children. An activated, antigen-presenting NG subset (APC) CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> was also found in these patients. Therefore, studies of surface NG membrane receptor expression, including HLA-DR, their regulation by peptides, and influence of the latter factors on correction on NG effector functions are of sufficient interest. Our objective was to evaluate the possibility of *in vitro* modulating the phenotype of CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> subsets of neutrophilic granulocytes under the influence of hexapeptide (HP) and glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP) in blood cells of children with acute hematogenous osteomyelitis using *in vitro* experimental tests.

Peripheral blood (PB) of 28 children with AHO aged 8-15 years was studied (the study group). 13 healthy children aged 8-15 years comprised the comparison group. To evaluate the effect of peptides, PB of children with AHO was cultured with HP (10<sup>-6</sup> g/L, 60 min, 37 °C): study group 1, and with GMDP (10<sup>-6</sup> g/L, 60 min, 37 °C) – study group 2. The number of NG CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> subsets, receptor expression density (MFI) (FC 500 “Beckman Coulter”, USA), phagocytic activity of NG, before and after cultivation were tested with these peptides.

In children with AHO, a subset of NG CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> is registered in 30.2 (16.4-34.9) %; with MFI, HLA-DR it comprised 3.5 (3.3-4.2) %. Under the influence of HP, a decrease of NG-APC and MFI HLA-DR numbers to 1.7 (1.6-2.2) (p<sub>1,2</sub> > 0.05) was revealed, due to binding of HP to HLA-DR (p > 0.05). Under the influence of GMDP, there is a significant increase in MFI CD66b and MFI CD33 receptors (p<sub>1,2</sub> < 0.05) in both subsets; there is an increase in MFI HLA-DR (p > 0.05) in the NG-APC subset. The modulating effects of HP and GMDP on the phenotype of NG CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> and CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> subsets may contribute to restoration of the phagocytic function of NG.

We have detected the “long-lived” activated NG subset CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> with the properties of APC, that can present antigen to T lymphocytes in PB of children with AHO. However, the important question exists, whether such a transformation will promote or slow down the progression of the purulent-inflammatory process? In this study, we have demonstrated *in vitro* the ability of two immunotropic peptides (HP, GMDP) to modulate the phenotype of NG-APC subset, thus potentially promoting recovery of the NG effector functions.

*Keywords:* neutrophil granulocytes, acute hematogenous osteomyelitis, children, antigen-presenting subset, hexapeptide, glucosaminylmuramyl dipeptide

## Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) больше не считаются популяцией окончательно дифференцированных, короткоживущих клеток. НГ представлены субпопуляциями с различными функциями, которые определяются в норме и при различных заболеваниях [5]. НГ рассматриваются как потенциальные регуляторы иммунного ответа (ИО) [8]. Функциональная пластичность позволяет НГ устанавливать сложные взаимосвязи с различными клетками иммунной системы (тромбоцитами, дендритными клетками, субпопуляциями лимфоцитов), влияя на их активность медиаторами как предварительно синтезированными, так и вновь синтезированными и, зачастую, определяя течение и исход воспалительного процесса в целом [12].

Очевидно, что НГ участвуют в реакциях адаптивного иммунитета, взаимодействуя с Т-клетками. Одним из механизмов является способность НГ экспрессировать молекулы HLA-DR [11]. Было показано, что НГ имеют в секреторных везикулах внутриклеточные запасы молекул HLA-DR и ко-рецепторов CD80 и CD86, которые при взаимодействии с LPS, fMLP, форбол-мири-стат-ацетатом (FMA) транслоцируются в течение 2-5 мин на поверхность клеток вследствие  $Ca^{2+}$ -зависимой перекрестной сшивки Mac-1 (CD11b/CD18) [1]. Экспрессия молекул HLA-DR и ко-рецепторов CD80, CD86 и CD83 у НГ здоровых лиц может быть также вызвана влиянием GM-CSF, IL-3 и  $IFN\gamma$  или их комбинацией, аутологичными Т-клетками, при этом типичные маркеры НГ (CD66b, CD15 и интегрин, включая CD11a/b/c) и функции сохраняются [8]. НГ-АПК присутствуют в ПК у пациентов с раком [15], инфекциями [4, 11] аллергическими и аутоиммунными заболеваниями [14]. Показано, что НГ, экспрессирующие молекулы HLA-DR, могут представлять антигены Т-клеткам  $CD4^+$ , которые в ответ на презентацию вырабатывают иммунорегуляторные цитокины, инициирующие ИО, что может приводить к замедлению развития заболевания или его усугублению [7]. В частности, было обнаружено, что у людей с ревматоидным артритом в синовиальной жидкости выявляются НГ с фенотипом АПК, которые при взаимодействии с Т-клетками вызывают их пролиферацию [14]. Субпопуляция НГ-АПК обнаружены в ПК пациентов с гиперлипидемией и в атеросклеротических бляшках мышей LDLr-/- . Клинические данные показывают положительную корреляцию между НГ-АПК и  $CD3^+$ Т-клетками, что подразумевает, что НГ-АПК могут способствовать прогрессированию атеросклероза посредством активации адаптивной иммунной системы [13]. С другой стороны, имеются данные о

том, что долгоживущие НГ-АПК стимулируют и усиливают реакции противоопухолевых эффекторных Т-клеток.

Работа Mysore V. и соавт. показывает, что связывание иммунных комплексов или человеческого конъюгата антитела IgG – Fc $\gamma$ R1IIb с антигеном, приводит к дифференцировке зрелых НГ в гибридные АПК клетки с фенотипом  $CD14^+HLA-DR^+CD11b^+CD66b^+CD15^{hi}$  в процессе, требующем эндоцитоза Fc $\gamma$ R. Данные НГ-АПК секретируют цитокины, иммуногенные, как классические ДК, и мигрируют в лимфатические узлы, где они взаимодействуют с Т-клетками. Установлено, что для генерации НГ-АПК необходим фактор транскрипции PU.1. Сгенерированные НГ-АПК активируют Т-клетки с противоопухолевыми свойствами, могут быть получены путем введения анти-Fc $\gamma$ R1II, конъюгированного с определенным антигеном, а клональные НГ, несущие неоантигены от пациентов с миелоидными новообразованиями, могут быть преобразованы в иммуногенные НГ-АПК, которые активируют Т-клетки антиген-независимым образом. Эти подходы могут быть использованы в качестве иммунотерапевтических стратегий на основе Т-клеток для лечения рака [12]. Также приведены доказательства того, что сгенерированные НГ-АПК эффективно обрабатывают вакцинные бактериальные токсины и активируют Т-клетки, что предполагает потенциальный способ борьбы с инфекциями. И наоборот, повышение НГ-АПК в крови пациентов с СКВ коррелирует с тяжестью заболевания, что предполагает, что они могут быть патогенными при аутоиммунных расстройствах [12].

Ранее в наших исследованиях при остром гематогенном остеомиелите (ОГО) выявлена и описана субпопуляция НГ-АПК с фенотипом  $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$  [2].

ОГО – гнойно-воспалительный процесс, особенностью которого – место локализации (кости, костный мозг, окружающие их мягкие ткани) содержащее все цитокины, необходимые для дифференцировки и созревания миелоидных клеток и лимфоцитов, под действием которых может изменяться ИО [2]. Ведущая роль в патогенезе ОГО принадлежит дисфункциям НГ. Появление на поверхностной мембране НГ при ОГО молекул HLA-DR свидетельствует о праймировании НГ, что предполагает возможность влияния на фенотип НГ, в том числе экспрессию HLA-DR, иными инициирующими факторами и представляет интерес для возможной коррекции их функций.

В этом плане изучение эффектов пептидов с доказанными иммунорегуляторными функциями и разными механизмами действия: синтетического гексапептида (Аргинил- $\alpha$ -Аспартил-Лизил-

Валил-Тирозил-Аргинин) – (ГП), способного связываться с молекулами HLA-DR [10], и глюкозаминилмурамилдипептида (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглютамин) – ГМДП, агониста NOD2-рецепторов на фенотип субпопуляций НГ, экспрессирующих рецепторы CD16, CD66b, CD33 и HLA-DR, является перспективным.

**Цель исследования** – оценить эффекты воздействия гексапептида и глюкозаминилмурамилдипептида в эксперименте *in vitro* на субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов при остром гематогенном остеомиелите у детей.

## Материалы и методы

Проведено изучение образцов ПК 28 детей с ОГО 8-15 лет (4 девочки, 24 мальчика) – группа исследования (ГИ); 13 условно здоровых детей 8-15 лет – группа сравнения (ГС).

Группа исследования 1 (ГИ1) – образцы ПК детей с ОГО культивировали с ГП ( $10^{-6}$  г/л) в течение 60 мин, 37 °С.

Группа исследования 2 (ГИ2) – образцы ПК детей с ОГО культивировали с ГМДП ( $10^{-6}$  г/л) в течение 60 мин, 37 °С.

Для оценки клеточных маркеров использовался цитометр FC 500 Beckman Coulter (США). Оценивали процент субпопуляций одновременно экспрессирующих CD16, CD66b, CD33 и экспрессирующих или не имеющих HLA-DR рецепторы (CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>НГ, CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>НГ); по интенсивности флуоресценции (MFI) определяли плотность экспрессии молекул до и после инкубации с иммуотропными пептидами.

CD66b (GPI – гликопротеин) – паннейтрофильный маркер, имеет низкую плотность экспрессии, которая значительно повышается при активации клетки [9].

CD16 (FcγIII) рецептор НГ (палочкоядерных и сегментоядерных форм). Повышенная экспрессия CD16 является признаком активации НГ. При тяжело протекающем инфекционном процессе зачастую из костного мозга в кровотоки поступают незрелые формы НГ, о чем говорит отсутствие или низкая экспрессия на их мембране CD16 [3].

CD33 (Siglec-3) представляет собой заякоренный в мембране клеток рецептор, который имеют незрелые клетки миелоидного ростка, а также зрелые НГ. Имеет в своем составе участки, богатые тирозином (ITIM), которые выполняют регулируемую роль в ингибировании клеточной активности [6].

HLA-DR – гликопротеин, который отсутствует на мембране циркулирующих НГ. Экспрессия HLA-DR на НГ повышается при активации последних, а также обнаруживается у тканевых форм НГ при воспалении [14].

Проводилась оценка фагоцитарной функции Н по способности НГ элиминировать *S. aureus* (штамм 209). Производился подсчет НГ, поглотивших бактерии – %ФАГ, фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ); оценивалась киллинговая способность НГ – процент (%П) и индекс (ИП) переваривания.

Статистическая обработка осуществлялась в Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2020. Результаты представлены в виде медианы и квартильного диапазона – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ); Статистические различия анализировались с использованием критерия Манна–Уитни. Значимыми считали различия значений при  $p < 0,05$ .

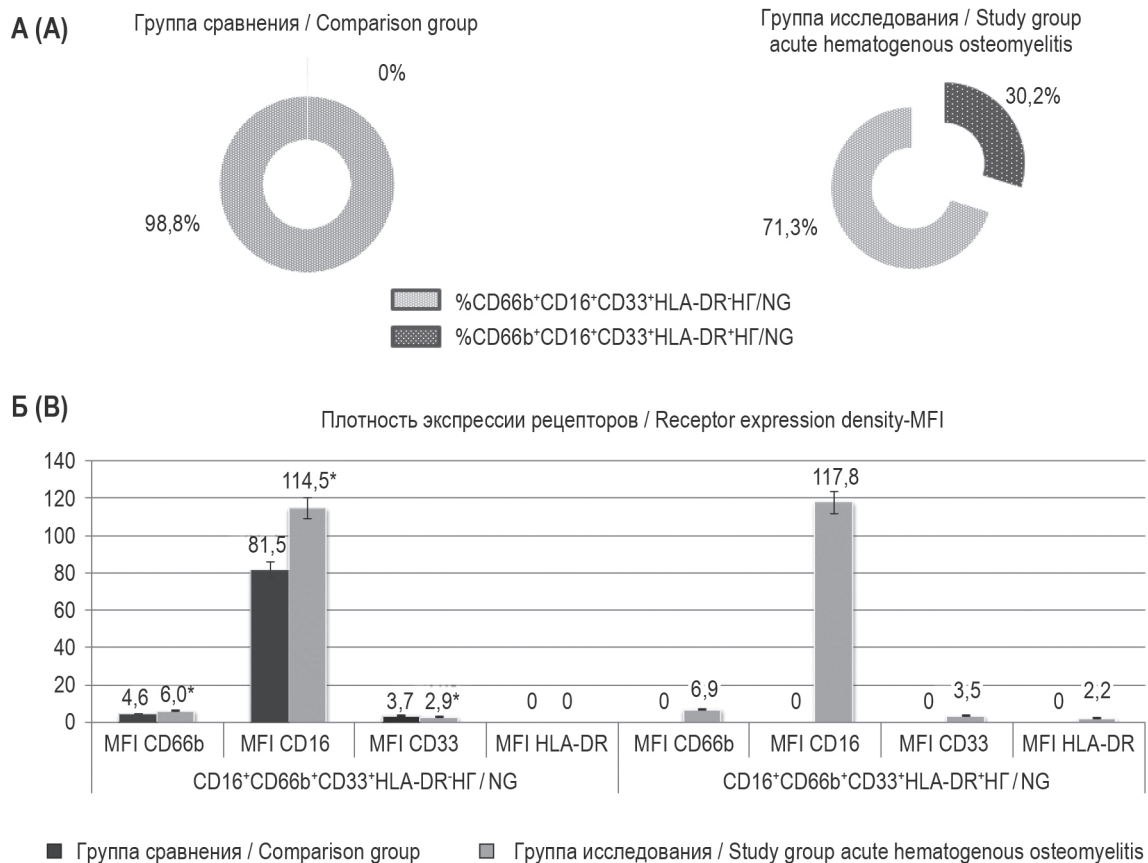
## Результаты и обсуждение

Установлено, что в образцах ПК ГС НГ были представлены в 98,8 (98,0-100) % субпопуляцией с фенотипом CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>НГ. По показателю MFI плотность экспрессии молекул составила для CD66b – 4,6 (4,2-5,0), CD33 – 3,7 (3,3-4,6), CD16 – 81,5 (69,2-99,1).

В ГИ были выявлены две субпопуляции НГ: 71,2 (52,5-80,5) % с фенотипом CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> и 30,3 (16,5-34,8) % с фенотипом CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, с плотностью экспрессии MFI HLA-DR – 2,2 (1,8-4,0). По отношению к ГС в ГИ выявлено снижение в 1,4 раза численности НГ субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ). Обе субпопуляции отличались от ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ) более высокой плотностью экспрессии молекул CD16 и CD66b. Наблюдалась более высокая плотность экспрессии CD33 – 3,5 (3,3-4,2) ( $p < 0,05$ ) в субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>НГ, уровень которого не отличался ( $p > 0,05$ ) от ГС в субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>НГ (рис. 1).

Выявленные изменения подтверждают данные литературы о том, что включение НГ в иммунный ответ сопровождается изменением их поверхностного репертуара рецепторов. Об этом свидетельствует мобилизация CD16 и CD66b из внутриклеточных депо клетки, что сопровождается потенцированием фагоцитарной и микробицидной активности НГ. Транслокация CD66b из внутриклеточных компартментов потенцирует протеинкиназу и выработку IL-8, что сопровождается привлечением в очаг воспаления НГ из циркуляторного русла [3]. Одновременно CD66b играет роль рецептора к галектину-3 на CD4<sup>+</sup> наивных Т-клетках и Т-клетках памяти [9]. Вза-





**Рисунок 1. Соотношение (А) и фенотипические характеристики (Б) субпопуляций CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> и CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов при остром гематогенном остеомиелите**

**Примечание.** \* – отличия показателей ГС и ГИ,  $p < 0,05$ .

Figure 1. Correlation (A) and phenotypic characteristics (B) of subsets CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> and CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> neutrophil granulocytes in acute hematogenous osteomyelitis

Note. \*, differences in indicators between the comparison group (CG) and the study group (SG),  $p < 0.05$ .

и влияние НГ и CD4<sup>+</sup> Т-клеток через контакт CD66b-галектин-3 приводит к экспрессии на НГ HLA-DR. Помимо этого, контакт НГ с CD4<sup>+</sup>Т-клетками через связывание HLA-DR и TCR стимулирует секрецию лимфоцитами цитокинов, которые вызывают дополнительную экспрессию HLA-DR на НГ [9].

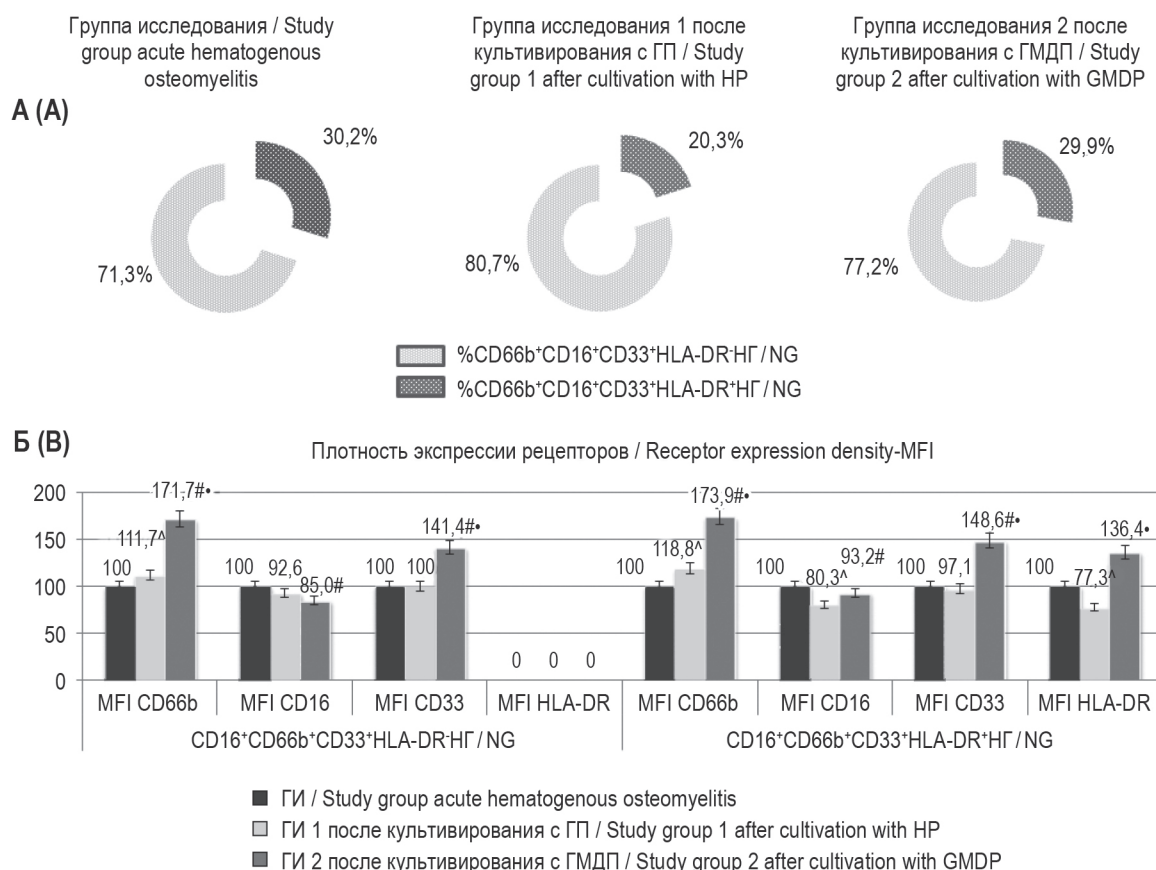
Под влиянием ГП в ГИ1 отмечено снижение доли субпопуляции НГ-АПК до 20,3 (18,7-39,0) % против 30,2 (16,4-34,9) % ( $p > 0,05$ ) до инкубации с ГП и повышение CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> НГ - 80,7 (72,5-84,5) % ( $p > 0,05$ ). Вероятно, перераспределение субпопуляций произошло из-за возможного связывания ГП с HLA-DR на мембране НГ. Кроме того, на НГ субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> выявлено снижение MFI HLA-DR до 1,7 (1,6-2,2), в 1,4 раза MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) в сравнении с показателями ГИ до инкубации ( $p > 0,05$ ) и, напротив, усиление в 1,3 раза плотности экспрессии CD66b – 8,2 (8,0-11,1) ( $p < 0,05$ ). Под действием ГП MFI CD16

и CD66b рецепторов ( $p_{1,2} > 0,05$ ) не изменялась на субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> НГ. Также в обеих субпопуляциях наблюдалось отсутствие влияния ГП на MFI молекул CD33 (рис. 2).

Несколько иные трансформации фенотипа выявлены под действием ГМДП.

Культивирование НГ ПК *in vitro* с ГМДП (ГИ2) не влияло на соотношение НГ исследуемых субпопуляций CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>.

В обеих субпопуляциях НГ под влиянием ГМДП было выявлено значимое повышение в 1,7 раз в сравнении с ГИ и в 1,5 раза в сравнении с ГИ1 после инкубации с ГП MFI CD66b ( $p_{1,2} < 0,05$ ), в 1,4 раза в сравнении с ГИ и ГИ1 MFI CD33 ( $p_{1,2} < 0,05$ ), тенденция снижения MFI CD16 ( $p_{1,2} > 0,05$ ). Также под влиянием ГМДП в субпопуляции НГ-АПК – CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> НГ определена выраженная по значениям медианы тенденция усиления плотности экс-



**Рисунок 2. Эффекты влияния гексапептида и глюкозаминилмурамилдипептида на соотношение (А) и фенотип (Б) субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при остром гематогенном остеомиелите**

**Примечание.** <sup>Δ</sup> – отличия показателей ГИ и ГИ 1,  $p < 0,05$ ; # – отличия показателей ГИ и ГИ 2,  $p < 0,05$ ; # – отличия показателей ГИ 1 и ГИ 2,  $p < 0,05$ .

Figure 2. Effects of hexapeptide and glucosaminylmuramyl dipeptide on the ratio (A) and phenotype (B) of subsets of neutrophil granulocytes in acute hematogenous osteomyelitis

Note. <sup>Δ</sup>, differences between SG and SG 1 indicators,  $p < 0.05$ ; #, differences between SG and SG 2 indicators,  $p < 0.05$ ; #, differences between SG 1 and SG 2,  $p < 0.05$ .

прессии HLA-DR ( $p > 0,05$ ) как в сравнении с показателями в ГИ, так и была в 1,5 раза выше, чем после влияния ГП (рис. 2).

При исследовании влияния ГП и ГМДП на фагоцитарную функцию НГ у детей с ОГО в системе *in vitro* были выявлены однонаправленные позитивные эффекты восстановления показателей %ФАГ и %П до значений ГС. Под влиянием ГП показан рост %ФАГ до 75,9 (70,1-77,0) % против 51,1 (42,7-58,0) % в ГИ и 54,8 (51,5-57,7) % в ГС ( $p_{1,2} < 0,05$ ); повышение киллинговой эффективности – %П с 41,8 (37,5-44,4) % в ГИ до 57,4 (53,4-61,4) % до показателей ГС – 64,6 (61,0-66,9) ( $p_{1,2} < 0,05$ ) (рис. 3).

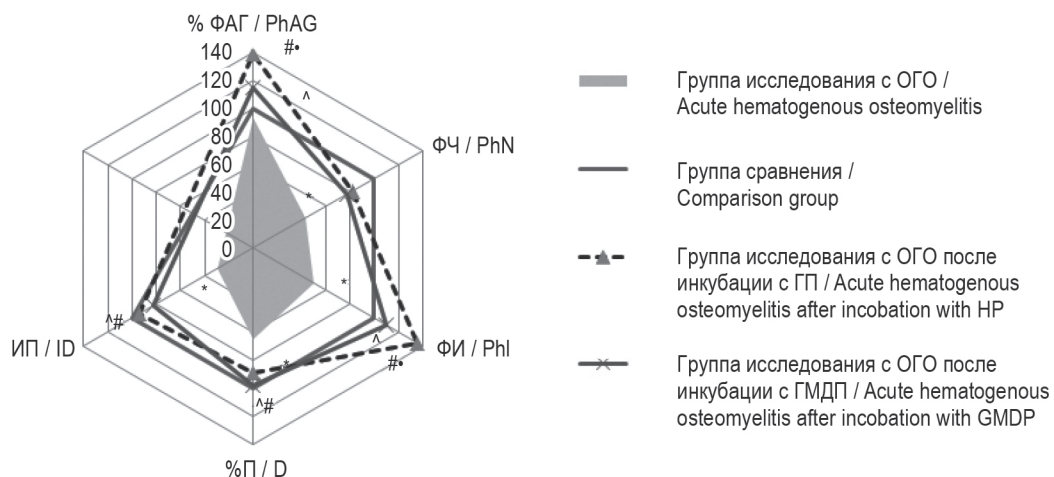
Под действием ГМДП также наблюдалось повышение %ФАГ 63,0 (52,0-65,0) % и %П 63,0 (59,3-66,9) до показателей ГС ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Полученные результаты экспериментального исследования очередной раз показывают

функциональную гибкость НГ и модулирующую роль ГП и ГМДП на популяции НГ CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> и CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, что дает возможность использовать иммунорегуляторные пептиды для восстановления дисфункций НГ.

Под влиянием ГМДП отмечается значимое повышение MFI CD 66b и MFI CD33 рецепторов ( $p_{1,2} < 0,05$ ) в обеих субпопуляциях, отмечается тенденция повышения MFI HLA-DR ( $p > 0,05$ ) на субпопуляции НГ-АПК. Роль CD33 на НГ малоизучена. Однако показано, что CD33 связываясь с ИТАМ, содержащими CD16 рецепторами, ингибирует цитотоксическую активность НК-лимфоцитов [6].

Эффекты влияния ГП в большей мере проявляются в отношении изменения фенотипа субпопуляции НГ – АПК. Отмечается повышение плотности экспрессии MFI CD66b ( $p < 0,05$ ),



**Рисунок 3. Изменение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов до и после культивирования *in vitro* с иммунорегуляторными пептидами при остром гематогенном остеомиелите у детей**

**Примечание.** \* – отличия показателей ГС и ФИ,  $p < 0,05$ ; ^ – отличия показателей ФИ и ФИ 1,  $p < 0,05$ ; # – отличия показателей ФИ и ФИ 2,  $p < 0,05$ ; \* – отличия показателей ФИ 1 и ФИ 2,  $p < 0,05$ .

Figure 3. Changes in the phagocytic activity of neutrophil granulocytes before and after cultivation *in vitro* with immunoregulatory peptides in acute hematogenous osteomyelitis in children

Note. \*, differences in indicators between the comparison group (CG) and the study group (SG),  $p < 0.05$ ; ^, differences between SG and SG 1 indicators,  $p < 0.05$ ; #, differences between SG and SG 2 indicators,  $p < 0.05$ ; \*, differences between SG 1 and SG 2,  $p < 0.05$ .

снижение MFI CD16 ( $p < 0,05$ ) и MFI HLA-DR ( $p > 0,05$ ).

Модулирующие эффекты ГП и ГМДП на фенотип субпопуляций НГ CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> приводят к восстановлению фагоцитарной функции НГ. Под влиянием ГП и ГМДП увеличение MFI молекулы CD66b ( $p_{1,2} < 0,05$ ), что способствует улучшению хемотаксиса и адгезивных свойств НГ, необходимых для реализации эффекторных функций. Кроме того, ГП статистически значимо уменьшает MFI CD16, снижая гиперактивацию клеток, направленную на цитотоксическую активность, дегрануляцию и формирование NETs.

## Заключение

Факт детекции в ПК детей с ОГО субпопуляции «долгоживущих» активированных НГ с фенотипом CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, со свойствами АПК, представляющих АГ Т-лимфоцитам, оставляет перед исследователями нерешенный вопрос: будет ли такая трансформация способствовать или замедлять прогрессирование гнойно-воспалительного процесса. В любом случае, выявленные различные эффекты иммунотропных пептидов в системе *in vitro* демонстрируют возможность модулировать фенотип субпопуляции НГ-АПК, способствуя восстановлению эффекторных функций НГ.

## Список литературы / References

1. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 1. С. 9-38. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K. Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 1, pp. 9-38. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38.
2. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чичерев Е.А., Чапурина В.Н., Митропанова М.Н. Антигенпрезентирующая субпопуляция CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов при остром остеомиелите у детей: иммуномодулирующие эффекты влияния иммунотропного гексапептида в экспериментальной системе *in vitro* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 899-890. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Mitropanova M.N. Antigen presenting subset of CD66b<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children: Immunomodulating effects of immunotropic hexapeptide in an *in vitro* experimental system". *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 899-906. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-APS-2776.

3. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, Vol. 28, no. 2, pp. 260-274.
4. Fites J.S., Gui M., Kernien J.F., Negoro P., Dagher Z., Sykes D.B., Nett J.E., Mansour M.K., Klein B.S. An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. *PLoS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 5, e1007073. doi: 10.1371/journal.ppat.1007073.
5. Hellebrekers P. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur. J. Clin. Investig.*, 2018, Vol. 48, e12943. doi: 10.1111/eci.12943.
6. Hernández-Caselles T., Martínez-Esparza M., Pérez-Oliva A.B., Quintanilla-Cecconi A.M., García-Alonso A., Álvarez-López D.M., García-Peñarrubia P. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 1, pp. 46-58.
7. Iking-Konert C., Csekö C., Wagner C., Stegmaier S., Andrassy K., Hänsch G.M. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2001, Vol. 79, no. 8, pp. 464-474.
8. Li Y., Wang W., Yang F., Xu Y., Feng C., Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun. Signal.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y.
9. Lin A., Loré K. Granulocytes: new members of the antigen-presenting cell family. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1781. doi: 10.3389/fimmu.2017.01781.
10. Liu Z., Zheng X., Wang J., Wang E. Molecular analysis of thymopentin binding to HLA-DR molecules. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 12, e1348. doi: 10.1371/journal.pone.0001348.
11. Moffat A., Gwyer Findlay E. Evidence for antigen presentation by human neutrophils. *Blood*, 2024, Vol. 143, no. 24, pp. 2455-2463.
12. Mysore V., Cullere X., Mears J., Rosetti F., Okubo K., Liew P.X., Zhang F., Madera-Salcedo I., Rosenbauer F., Stone R.M., Aster J.C., von Andrian U.H., Lichtman A.H., Raychaudhuri S., Mayadas T.N. FcγR engagement reprograms neutrophils into antigen cross-presenting cells that elicit acquired anti-tumor immunity. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, 4791. doi:10.1038/s41467-021-24591-x.
13. Soehnlein O., Steffens S., Hidalgo A., Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, pp. 248-261.
14. Vono M., Lin A., Norrby-Teglund A., Koup R.A., Liang F., Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *ex vivo*. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 14, pp. 1991-2001.
15. Wu Y., Ma J., Yang X., Nan F., Zhang T., Ji S., Rao D., Feng H., Gao K., Gu X., Jiang S., Song G., Pan J., Zhang M., Xu Y., Zhang S., Fan Y., Wang X., Zhou J., Yang L., Fan J., Zhang X., Gao Q. Neutrophil profiling illuminates anti-tumor antigen-presenting potency. *Cell*, 2024, Vol. 187, pp. 1422-1439.e24.

**Авторы:**

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

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

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

**Authors:**

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

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

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