

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ ЦИТОКИНОВ IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ НА АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩУЮ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ СУБПОПУЛЯЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ГЕМАТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

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

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

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

Резюме. Дисфункции иммунной системы, в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов (НГ), являются причиной возникновения и прогрессирования очага инфекции в костной ткани, костном мозге при остром гематогенном остеомиелите (ОГО). При колонизации кости *S. aureus* остеобласты, остециты и макрофаги секретируют хемоаттрактанты и цитокины, инициирующие приток к месту инфекции большого количества НГ, которые в свою очередь секретируют цитокины, создавая воспалительную микросреду, способствующую образованию остеокластов резорбирующих кость. Известно, что цитокин-активируемые НГ претерпевают функциональные и фенотипические изменения. В этой связи интерес представляет выявление цитокинов, приводящих к трансформации фенотипа НГ в антигенпрезентирующие клетки (АПК) при ОГО. Цель исследования — определить уровни нейтрофил-ассоциированных сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ и их взаимосвязь с количественными и фенотипическими характеристиками субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺НГ при местночаговой и септико-пиемической формах ОГО у детей.

Исследованы 28 детей 8-15 лет с ОГО: группа 1 — 20 детей с местночаговой формой; группа 2 — 8 детей с септико-пиемической формой; группа сравнения — 13 условно здоровых детей. Определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, плотность экспрессии рецепторов (MFI) (FC 500, МкАт Beckman Coulter, США); сывороточные цитокины IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ ИФА (ASCENT, Финляндия), тест-системы Cloud-Clone Corp. (США).

Показано появление в периферической крови (ПК) детей с различными формами тяжести ОГО двух активированных субпопуляций: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ с фенотипом АПК, способных

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова, Ю.В. Тетерин, К.И. Мелконян, М.Г. Атажахова, В.Н. Чапурина, Е.А. Чичерев «Неоднозначность влияний цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ на антигенпрезентирующую CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ субпопуляцию нейтрофильных гранулоцитов детей с острым гематогенным остеомиелитом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1085-1092.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

© Чудилова Г.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.A. Chudilova, I.V. Nesterova, Yu.V. Teterin, K.I. Melkonyan, M.G. Atazhakhova, V.N. Chapurina, E.A. Chicherev "Ambiguity of the influence of cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , AND IFN γ on the antigen presenting CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subpopulation of neutrophil granulocytes in children with acute hematogenic osteomyelitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1085-1092.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

© Chudilova G.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

презентировать суперантиген *S. aureus* Т-лимфоцитам и субпопуляция с высокой цитотоксической активностью CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ на фоне высоких концентраций сывороточных цитокинов IFN γ , IL-17 и повышенного уровня TNF α . Исходя из того, что степень активации НГ коррелирует со степенью воспалительного разрушения тканей, в том числе костной ткани, определение уровня IFN γ , IL-17 может быть полезным для оценки степени тяжести ОГО, а также для возможного контроля за течением инфекционно-воспалительных процессов, происходящих в костной ткани.

Принимая во внимание ведущую роль НГ в реализации различных воспалительных реакций, определение экспрессии HLA-DR, с целью детекции появления в ПК пациентов субпопуляции АПК-НГ, может иметь диагностическое значение не только при ОГО, но и при других тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, антигенпредставляющая субпопуляция, цитокины, острый гематогенный остеомиелит, местночаговая форма, септико-пиемическая форма, дети

AMBIGUITY OF THE INFLUENCE OF CYTOKINES IL-8, IL-17A, TNF α , AND IFN γ ON THE ANTIGEN PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBPOPULATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE HEMATOGENIC OSTEOMYELITIS

Chudilova G.A.^a, Nesterova I.V.^{a, b}, Teterin Yu.V.^a, Melkonyan K.I.^a, Atazhakhova M.G.^a, Chapurina V.N.^a, Chicherev E.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Abstract. Dysfunctions of the immune system, in turn, of neutrophil granulocytes (NG), are the cause of the emergence and progression of the focus of infection in bone tissue and bone marrow in acute hematogenous osteomyelitis (AHO). When colonizing bones, *S. aureus*, osteoblasts, osteocytes and macrophages secrete chemoattractants and cytokines, which initiate the influx of large amounts of NG into the site of infection, which, in turn, secrete cytokines and form an inflammatory microenvironment that promotes the formation of osteoclasts that resorb bone. It is known that NG activated by cytokines undergo functional and phenotypic changes. In this regard, detecting the cytokines that lead to the transformation of the NC phenotype into an antigen-presenting cell (APC) in AHO is of interest. Goal, to determine the levels of neutrophil-associated serum cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ and their relationship with numerous and phenotypic characteristics of subpopulations CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺NG in localized and septicopyemic forms of CSO in children.

Children (N = 28) aged 8-15 years with AHO were studied: group 1 – 20 children with a localized form; group 2 – 8 children with septicopyemic form; and a comparison group of 13 conditionally healthy children. The number of NG subpopulations CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, receptors mean expression intensity (MFI) (FC 500, mAb Beckman Coulter, USA); serum cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ ELISA (ASCENT, Finland), test systems Cloud-Clone Corp. (USA).

The appearance of two activated subpopulations in the peripheral blood (PB) of children with various forms of AHO severity were found: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ with the APC phenotype, capable of presenting the *S. aureus* superantigen for T lymphocytes and a subpopulation with high cytotoxic activity CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ while concentrations of serum cytokines IFN γ , IL-17 are high and levels of TNF α are increased. Due to the fact that the NG activation range correlates with the range of inflammatory tissue damage, including bone tissue, determination of the level of IFN γ , IL-17 can be useful for assessing the severity of AHO, and also possibly for monitoring infectious and inflammatory processes occurring in the bone tissue.

Taking into account the leading role of NG in various inflammatory reactions, determining the expression of HLA-DR, in order to identify the manifestation of the APC-NG subpopulation in peripheral blood, may have diagnostic value not only for AHO, but also for other manifestations of infectious and inflammatory diseases.

Keywords: neutrophil granulocytes, antigen-presenting subpopulation, cytokines, acute hematogenous osteomyelitis, localized form, septicopyemic form, children

Введение

Неэффективность противобактериальной как локальной, так и системной иммунной защиты обуславливает возникновение острого гематогенного остеомиелита (ОГО) у иммунокомпрометированных детей. При этом может наблюдаться повышенная ломкость костей и их ремоделирование, изменение кровоснабжения за счет нарушения сосудистой сети, приводящее к ускоренному некрозу костей, образованию секвестров с возможной дальнейшей хронизацией инфекционного процесса и инвалидизацией пациентов [5, 10]. ОГО — инвазивный инфекционный процесс, вызванный гематогенным распространением *S. aureus*, поражающий кости и/или костный мозг, трудно диагностировать из-за гетерогенности патофизиологии и клинической картины [4, 10]. При колонизации кости *S. aureus* остеобласты, остециты и резидентные макрофаги (МФ) секретируют хемоаттрактанты, инициирующие приток к месту инфекции лейкоцитов, в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов (НГ), моноцитов (МОН), Т- и В-лимфоцитов [4].

НГ могут элиминировать *S. aureus* посредством фагоцитоза, выработки активных форм кислорода (АФК), антимикробных пептидов, таких как кателицидин, лизоцим, азуорицин, выработки протеаз для прямого уничтожения патогенов (кателицидин G, эластаза, желатиназа и коллагеназа) и интернализации, активации деградационных ферментов и катионных пептидов в гранулах, образования внеклеточных ловушек NETs и презентации [8]. Однако *S. aureus* оказывает ряд негативных эффектов на НГ, нарушая хемотаксис, фагоцитарную и микробицидную функции, индуцируя процессы формирования NETs, что вызывает разрушение тканей и помогает бактериям выживать и распространяться в очаге инфекции [2].

НГ, МФ, ЛФ в микроокружение кости выделяют цитокины (IL-17, IL-10, IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-18, IL-4, IL-8 TNF α , INF γ , TGF- β), хемокины (CCL3), факторы роста (M-CSF, G-CSF), которые впоследствии привлекают и активируют еще больше НГ, создавая воспалительную среду, способствующую образованию остеокластов, резорбирующих кость [4]. НГ имеют многочисленные рецепторы к цитокинам IL-8, TNF α , IL-1, IL-2, IL-17, IFN α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15 и т. д., и было показано, что цитокин-активируемые НГ претерпевают функциональные и фенотипические изменения [12].

Показано, что при посттравматическом остеомиелите у взрослых в поврежденных костях количество остеокластов коррелирует с количеством инфильтрированных НГ, которые были

высоко активированы, о чем свидетельствовали экспрессия на поверхностной мембране рецепторов HLA-DR и способность этих НГ секретировать IL-8 [4]. Было установлено, что HLA-DR-позитивные НГ презентуют Т-хелперам (Th) суперантиген *S. aureus* посредством сшивки молекулы HLA-DR с вариабельной частью α -цепи TCR [7], возможно, компенсируя функции дендритных клеток (ДК), заблокированные фактором вирулентности *S. aureus* лейкоцидином AB, которые играют ключевую роль в презентации антигена и активации Th [13]. Ранее нами была выявлена и описана антигенпрезентирующая субпопуляция НГ — CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ у детей с ОГО [1].

В этой связи представило интерес определение цитокинов, приводящих к трансформации фенотипа НГ в АПК, а также установление взаимосвязи между уровнем цитокинового фона и количественными и фенотипическими характеристиками антигенпредставляющей субпопуляции НГ при различных по тяжести формах ОГО.

Поверхностные мембранные рецепторы CD16, CD66b, CD33 являются надежными маркерами НГ.

CD66b (CEACAM8) определяется только на НГ. Плотность экспрессии CD66b молекул повышается при активации НГ, участвующих в адгезии к эндотелиальным клеткам, дегрануляции и увеличении АФК [15]. Известно, что CD66b обеспечивает взаимодействие НГ с CD4⁺Т-клетками памяти. Взаимодействия CD66b рецептор-лиганд галектин-3, экспрессируемый Т-клетками памяти, инициируют экспрессию HLA-DR на мембране НГ [15]. В свою очередь, взаимодействие НГ-HLA-DR с TCR активирует Т-лимфоциты, секретирующие цитокины, которые вызывают усиление экспрессии HLA-DR на мембране НГ. Образуется петля положительной обратной связи, которой принадлежит ведущая роль в индукции и поддержании презентации антигена НГ [7].

CD16 (Fc γ RIII) — маркер палочкоядерных и сегментированных НГ. Высокая плотность экспрессии CD16 на поверхностной мембране НГ — показатель гиперактивации НГ, тогда как сниженная экспрессия характерна для незрелых форм НГ или нарушении эффекторных функций НГ при тяжелых инфекционно-воспалительных процессах.

CD33 (Siglec-3) — маркер дифференцировки миелоидных клеток. CD33-рецепторы имеют в структуре ITIM ингибиторные мотивы на основе тирозина, которые могут снижать активность НГ при инфекциях или некрозах тканей [9].

HLA-DR выявляется на поверхности тканевых НГ при некоторых аутоиммунных заболеваниях — ревматоидный артрит, гранулематоз Ве-

генера, и не экспрессируется на циркулирующих НГ [11].

Особый интерес для исследования представляют нейтрофил-ассоциированные цитокины, которые регулируют функции НГ и синтезируются НГ: IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ .

IL-8 является основным цитокином, продуцируемым активированными НГ, поэтому существуют предположения, что при персистирующей инфекции инфильтрация НГ способствует индукции образования остеокластов, обеспечивая тем самым связь между воспалением и эрозией кости [4].

IFN γ — IFN типа II, продуцируется широким спектром клеток: NK-клетками, Т- и В-лимфоцитами и МОН / МФ, ДК и НГ. IFN γ регулирует активацию НГ и МФ, усиление эффекторных функций, индуцируя синтез iNOS и NADPH-оксидазы, протеина NRAMP-1, который повышает резистентность МФ к микроорганизмам [12].

IL-17A синтезируется Th17, CD8⁺Т-лимфоцитами, γ Т-клетками, NK-клетками и IL-С3, НГ. IL-17 действует как нейтрофильный цитокин, способствующий воспалению, образованию NETs и повреждению тканей при инфекции. Через синтез IL-17 НГ привлекают Th17, которые в свою очередь рекрутируют больше НГ [3, 6].

TNF α — многофункциональный провоспалительный цитокин, регулирующий иммунитет, клеточный апоптоз, является драйвером цитокинового шторма, вызванного суперантигеном [3].

Учитывая, что реакция на *S. aureus* в костях и костном мозге имеет уникальные особенности при сравнении с инфекционными процессами в других тканях, контроль воспаления, в частности с помощью провоспалительных сывороточных цитокинов или выявления активированных субпопуляций НГ, может быть ценным диагностическим вариантом для предотвращения хронизации процесса и ранней потери костной массы.

Цель исследования — определить уровни нейтрофил-ассоциированных сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ и их взаимосвязь с количественными и фенотипическими характеристиками субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ нейтрофильных гранулоцитов при местночаговой и септико-пиемической формах острого гематогенного остеомиелита у детей.

Материалы и методы

В исследование были включены 28 детей с ОГО, в возрасте 8-15 лет. На основе клинико-лабораторных данных были сформированы 2 группы исследования. В группу исследования 1 (ГИ1)

были включены 20 детей с местночаговой формой ОГО. В группу исследования 2 (ГИ2) вошли 8 детей 8-15 лет с септико-пиемической формой ОГО. Группу сравнения (ГС) составили 13 условно здоровых детей 8-15 лет.

Тестировалось количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флуоресценции (MFI) (Cytometer FC 500, Beckman Coulter, МкАт, Beckman Coulter International S.A., Франция). Методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ASCENT, Финляндия) определяли уровень сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ с использованием тест-систем Cloud-Clone Corp. (США).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в программе Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2020. После оценки нормальности распределения показателей проводился анализ по критерию Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы и квартильных интервалов — Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Статистически значимые различия считались при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование сыворотки крови детей с ОГО с местночаговой формой выявило статистически значимое повышение уровня исследуемых нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ .

Так, в ГИ1 отмечается повышение уровня IL-8 в 5 раз, IL-17A в 3,9 раз, в 2,2 раза TNF α в сопоставлении с показателями ГС ($p_{1-3} < 0,05$) (табл. 1). Наиболее высокие значения показателей по отношению к ГС были установлены для IFN γ , концентрация которого повышалась в 462 раза и составила 4308,2 (4047,3–4380,4) пг/мл против 9,32 (8,9–9,6) в ГС ($p < 0,05$).

В ГИ2 ОГО с септико-пиемической формой уровень IL-8 не отличался от значений ГС ($p > 0,05$) и был в 6,4 раза ниже чем в ГИ1 ($p < 0,05$). При этом уровень IL-17A был в 53 раза выше в сопоставлении с показателями ГС ($p < 0,05$) и в 14 раз в сравнении с ГИ1 ($p < 0,05$). Также выявлено повышение TNF α в 3,8 раз по отношению к ГС ($p < 0,05$) и в 1,8 раз против значений ГИ1 ($p > 0,05$). Уровень IFN γ в 376 раз был выше относительно ГС — 3505,3 (3481,6–4040,8) против 9,32 (8,9–9,6) ($p < 0,05$), однако был в 1,2 раза ниже, чем в ГИ1 — 4308,2 (4047,3–4380,4) ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ исследуемых цитокинов показал, что для группы с мелкоочаговой формой характерно значимое повышение уровней IFN γ и IL-8, более умеренное повышение IL-17A; в группе с септико-пиемической формой ОГО также отмечался высокий уровень IFN γ ,

однако он был ниже, чем в ГИ1, и наблюдался высокий уровень IL-17A; в обеих группах была одинаково повышена концентрация TNFα. При этом в ГИ2 уровень IL-8 не отличался от показателей ГС.

Согласно литературным данным, под влиянием *in vitro* и *in vivo* цитокинов IFNγ, GM-CSF, IL-3, TNFα на НГ в КМ индуцируется HLA-DR, и при этом сохраняются все свойства НГ [9].

Для уточнения роли влияния цитокинового фона на НГ при ОГО проведено исследование субпопуляции, одновременно экспрессирующей рецепторы CD66b, CD16, CD33, HLA-DR, на фоне измененного профиля сывороточных нейтрофил-ассоциированных провоспалительных цитокинов IL-8, IL-17A, IFNγ, TNFα.

Показано, что в ГС в периферической крови 98,8 (98,0-100) % НГ представлены одной субпопуляцией CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺. Фенотип данной субпопуляции характеризуется низкой плотностью экспрессии рецепторов CD66b и CD33: MFI CD66b – 4,6 (4,2-5,0), MFI CD33 – 3,7 (3,3- 4,6), средним значением MFI CD16 – 81,45 (69,3-99,2).

При фенотипировании НГ в ГИ1 и ГИ2 с ОГО были выявлены две субпопуляции НГ: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ и субпопуляция, экспрессирующая HLA-DR рецептор, приобретающая фенотип антигенпредставляющих клеток – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ (табл. 2).

В ГИ1 субпопуляция CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ составляла 30,2 (16,4-34,9) %, с плотность экспрессии рецепторов по MFI HLA-DR – 2,2 (1,8-4,0), MFI CD66b – 6,9 (5,9-7,7), MFI CD16 – 117,8

(110,3-140,0) и MFI CD33 – 3,5 (3,3-4,2) (табл. 2). При этом было определено снижение в 1,4 раза доли НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ до 69,3 (61,25-76,8) % в сопоставлении с 98,8 (98,0-100) % в ГС (p < 0,05). Также отмечалось изменение фенотипа этой субпопуляции – увеличение MFI CD16 до 114,5 (100,3-139,0) против 81,45 (69,3-99,2) и CD66b до 6,23 (5,7-7,3) против 4,6 (4,2-5,0) (p_{1,2} < 0,05) и снижение MFI CD33 – до 2,9 (2,5-3,1) против 3,7 (3,3-4,6) (p > 0,05).

В ГИ2 количество НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ в 1,5 раза превышало содержание в ГИ1 (p < 0,05), но при этом было выявлено снижение плотности в 1,6 раз экспрессии MFI HLA-DR, в 1,2 раза MFI CD66b (p_{1,2} < 0,05), тенденция к снижению MFI CD16 (p > 0,05), при этом MFI CD 33 не отличался от ГИ1 (p > 0,05).

Наблюдалось также снижение содержания НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ в 8 раз при сопоставлении с ГС (p < 0,05) и в 1,5 раза в сравнении с ГИ1 (p < 0,05). Плотность экспрессии изучаемых рецепторов на данной субпопуляции не отличалась от величин, регистрируемых в ГИ1 (p > 0,05), при этом MFI CD66b, MFI CD16 были выше, а MFI CD33 ниже значений ГС (p₁₋₃ < 0,05).

Таким образом, в результате исследования установлено, что при ОГО у детей на системном уровне определяются высокие концентрации IFNγ при местночаговой и септико-пиемической формах и IL-17A, более значимые при септико-пиемической форме. Кроме того, определены повышенные уровни TNFα при обеих формах ОГО и IL-8 при местночаговой форме.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ НЕЙТРОФИЛ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРОМ ГЕМАТОГЕННОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF NEUTROPHIL-ASSOCIATED CYTOKINES IN ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS IN CHILDREN 8-15 YEARS OLD, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Группа сравнения Comparison group	ГИ 1 ОГО местночаговой формой Study group 1 acute hematogenous osteomyelitis localized form	ГИ2 ОГО септико-пиемической формой Study group 2 acute hematogenous osteomyelitis septicopyemic form
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	9,1 (7,6-12,6)	35,1 (24,2-95,0)*	484,4 (305,20-2667,95)*^
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	5,6 (3,7-7,0)	28,3 (9,1-41,8)*	4,4 (3,5-16,4)^
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/mL	9,32 (8,9-9,6)	4308,2 (4047,3-4380,4)*	3505,3 (3481,6-4040,8)*^
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	4,8 (2,2-5,9)	10,5 (7,2-29,1)*	18,2 (12,6-23,8)*

Примечание. * – значимые различия между показателями группы сравнения и группы исследования 1 (ГИ1), p < 0,05; ^ – значимые различия между показателями группы исследования 1 и группы исследования 2, p < 0,05.

Note. *, significant differences between the indicators of the comparison group and study group 1 (SG1), p < 0.05; ^, significant differences between the indicators of study group 1 and study group 2, p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ И CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ГЕМАТОГЕННОГО ОСТЕОМИЕЛИТА, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. QUANTITATIVE AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SUBSETS OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ AND CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ IN DIFFERENT FORMS OF ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Группа сравнения Comparison group	ГИ 1 ОГО местноочаговой формой Study group 1 acute hematogenous osteomyelitis localized form	ГИ2 ОГО септико-пиемической формой Study group 2 acute hematogenous osteomyelitis septicopyemic form
% НГ % NG CD16 ⁺ CD66b ⁺ CD33 ⁺ HLADR ⁻	98,8 (98,0-100,0)	69,3 (61,25-76,8)*	47,6 (36,2-58,9)**^
MFI CD66b	4,6 (4,2-5,0)	6,2 (5,7-7,3)*	6,7 (5,3-7,0)*
MFI CD16	81,5 (69,3-99,2)	114,5 (100,3-139,0)*	106 (99,7-126,0)*
MFI CD33	3,7 (3,3-4,6)	2,9 (2,5-3,1)*	2,9 (2,1-3,0)*
% НГ % NG CD16 ⁺ CD66b ⁺ CD33 ⁺ HLADR ⁺	0	30,2 (16,4-34,9)	46,7 (36,2-48,1)**^
MFI CD66b	0	6,9 (5,9-7,7)	5,7 (5,0-6,0)^
MFI CD16	0	117,8 (110,3-140,0)	106,0 (99,7-126,0)
MFI CD33	0	3,5 (3,18-4,20)	3,4 (3,3-3,4)
MFI HLA-DR	0	2,2 (1,8-4,0)	1,4 (1,4-1,5)^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Полученные результаты частично совпадают с данными, полученными другими исследователями, которые показали, что остеомиелит сопровождается изменениями местного и иногда системного уровня как провоспалительных IL-6, IL-1 α , TNF α , IL-1 β , так и противовоспалительных TGF- β цитокинов [5].

В ходе включения НГ в иммунный ответ под влиянием цитокинов в обеих исследуемых группах пациентов с ОГО на НГ индуцируется экспрессия HLA-DR рецепторов на 30,6% НГ в ГИ1 и на 46,7% НГ в ГИ2, плотность экспрессии, очевидно, зависит от комплексного влияния цитокинов в ГИ1 — от IFN γ , IL-8, а в ГИ2 — от IFN γ , IL-17A и соотношения их уровней.

Тот факт, что при наличии большего содержания НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ при более тяжелой форме ОГО плотность экспрессии HLA-DR была ниже, чем при более легкой форме, можно объяснить опубликованными недавно данными о том, что АПК НГ неоднородны и среди них при сепсисе определяется субпопуляция «стареющих АПК» НГ, которые лучше, чем обычные АПК НГ с соответствующим фенотипом, индуцировали клетки Th2 и Th17, продуцировали IL-4 и IL-17 [6].

Существуют данные, свидетельствующие о том, что при остеомиелитах TNF α , IL-1, IL-6, IL-21 и IL-23 усиливают экспрессию ROR γ t и ингибируют экспрессию FoxP3, что индуцирует дифференцировку Th в Th17 и супрессирует Т-регуляторные клетки (Treg) [14]. Th17 и Treg связаны с персистенцией остеомиелитического процесса и разрушением костей [14]. Th17 секретируют IL-17, способствующий воспалению, индуцирующий активированные НГ к образованию NETs и повреждению костной ткани. В свою очередь, НГ синтезируют и секретируют IL-17, привлекая Th17 [3], а те в свою очередь рекрутируют еще большее количество НГ в зону воспаления [6].

С другой стороны, под действием цитокинов на НГ субпопуляций как CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, так и CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, выявляется дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов CD16, CD66b рецепторов на мембрану НГ, что проявляется в приросте количества высоко активированных НГ. Через CD16-рецепторы происходит активация цитотоксических функций НГ-дегрануляции, окислительного взрыва, антителозависимой клеточной цитотоксичности, фагоцитоза, что позволяет

НГ уничтожать опсонизированные патогены [1, 9]. Известно, что цитокины, особенно $IFN\gamma$, сохраняют экспрессию CD16, усиливают фагоцитарную активность и пролонгируют продолжительность жизни НГ [9].

В свою очередь, активация CD66b на поверхности НГ индуцирует функциональные реакции, такие как агрегация клеток, дегрануляция и активация протеинкиназ, увеличение продукции АФК. Кроме того, активация CD66b на мембране НГ способствует секреции предсинтезированного IL-8, который участвует в привлечении других НГ в зону воспаления [15].

Все вышеизложенное обуславливает целесообразность проведения дальнейших исследований роли сывороточных нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL-8, IL-17, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ и определения их ролевого участия в репаративно-воспалительных процессах в костной ткани.

Заключение

В настоящем исследовании показано появление в периферической крови детей с различными формами тяжести ОГО двух активированных

субпопуляций: $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ с фенотипом АПК, способных презентировать суперантиген *S. aureus* Т-лимфоцитам, и субпопуляция с высокой цитотоксической активностью $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^-$ на фоне высоких концентраций сывороточных цитокинов $IFN\gamma$, IL-17 и повышенного уровня $TNF\alpha$. Исходя из того, что степень активации НГ коррелирует со степенью воспалительного разрушения тканей, в том числе костной ткани, определение уровня сывороточных цитокинов $IFN\gamma$, IL-17 может быть полезным для оценки степени тяжести ОГО, а также для возможного контроля за течением инфекционно-воспалительных процессов, происходящих в костной ткани.

Принимая во внимание ведущую роль НГ в реализации различных воспалительных реакций, определение экспрессии HLA-DR на этих клетках с целью детекции появления в периферической крови пациентов субпопуляции АПК-НГ может иметь важное диагностическое значение не только при ОГО, но и при других тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваниях, в возникновении которых могут участвовать патогенетически значимые суперантигены.

Список литературы / References

1. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чичерев Е.А., Чапурина В.Н., Митропанова М.Н. Антигенпрезентирующая субпопуляция гранулоцитов при остром остеомиелите у детей: иммуномодулирующие эффекты влияний иммуотропного гексапептида в экспериментальной $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ нейтрофильной системе *in vitro* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 899-906. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Mitropanova M.N. Antigen presenting subset of $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children: Immunomodulating effects of immunotropic hexapeptide in an *in vitro* experimental system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 899-906. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-APS-2776.
2. Chen Y., Liu Z., Lin Z., Lu M., Fu Y., Liu G., Yu B. The effect of *Staphylococcus aureus* on innate and adaptive immunity and potential immunotherapy for *S. aureus*-induced osteomyelitis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1219895. doi: 10.3389/fimmu.2023.1219895.
3. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 23, pp. 2255-2273.
4. Gaida M.M., Mayer B., Stegmaier S., Schirmacher P., Wagner C., Hansch G.M. Polymorphonuclear neutrophils in osteomyelitis: link to osteoclast generation and bone resorption. *Eur. J. Inflam.*, 2012, no. 10, pp. 413-426.
5. Granata V., Possetti V., Parente R., Bottazzi B., Inforzato A., Sobacchi C. The osteoblast secretome in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1048505. doi: 10.3389/fimmu.2022.1048505.
6. Jin H., Aziz M., Murao A., Kobritz M., Shih A.J., Adelson R.P., Brenner M., Wang P. Antigen-presenting aged neutrophils induce $CD4^+$ T cells to exacerbate inflammation in sepsis. *J. Clin. Invest.*, 2023, Vol. 133, no. 14, e164585. doi: 10.1172/JCI164585.
7. 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.
8. Lüthje F.L., Jensen L.K., Jensen H.E., Skovgaard K. The inflammatory response to bone infection – a review based on animal models and human patients. *APMIS*, 2020, no. 128, pp. 275-286.
9. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima M. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 10, pp. 1677-1689.
10. Muthukrishnan G., Masters E.A., Daiss J.L., Schwarz, E.M. Mechanisms of immune evasion and bone tissue colonization that make *staphylococcus aureus* the primary pathogen in osteomyelitis. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2019, no. 17, pp. 395-404.
11. Sandilands G.P., McCrae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*, 2006, Vol. 119, no. 4, pp. 562-571.

12. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon". *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, Suppl. 2, e12952. doi: 10.1111/eci.12952.
13. Tekguc M., Wing J.B., Osaki M., Long J., Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2021, Vol. 118, no. 30, e2023739118. doi: 10.1073/pnas.2023739118.
14. Tyagi A.M., Yu M., Darby T.M., Vaccaro C., Li J.Y., Owens J.A., Hsu E., Adams J., Weitzmann M.N., Jones R.M., Pacifici R. The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 6, pp. 1116-1131.e7.
15. Yoon J., Terada A., Kita H. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 8454-8462.

Авторы:

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

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

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

Мелконян К.И. — к.м.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Атажахова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

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

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

Authors:

Chudilova G.A., DPhD, 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 of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

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

Melkonyan K.I., PhD (Medicine) Head, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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