

ВЛИЯНИЕ ОПСОНИНОВ СВЕЖЕЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРИ 56 °С СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ЗИМОЗАН-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЛЕЙКОЦИТАМИ КРЫС

© 2019 г. Ю. И. Шилов^{1,2*}, А. П. Годовалов², Д. Ю. Шилов³,
С. Ю. Шилов^{1,2}, Daniel Eliáš⁴

*E-mail: jshilov@mail.ru

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия;

³ООО «МК «Семейный доктор», Москва, Россия;

⁴Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Исследовали продукцию активных форм кислорода лейкоцитами крови и костного мозга в реакции люминолзависимой хемилюминесценции под действием неопсонизированного зимозана и зимозана, опсонизированного свежей или инактивированной при 56 °С аутологичной сывороткой. Установлено, что повышение показателей хемилюминесценции имеет место во всех трех вариантах активации фагоцитов, но в наибольшей степени оно выражено при использовании свежей сыворотки.

Ключевые слова: люминолзависимая хемилюминесценция, зимозан, опсонизация, лейкоциты крови, миелоциты, крысы

DOI: 10.31857/S102872210006498-2

Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13 «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Шилов Юрий Иванович. Тел. +7(342) 2807442; факс (342) 2809211.

E-mail: jshilov@mail.ru

Авторы:

Шилов Ю. И., к.м.н., доцент, в.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Годовалов А. П., к.м.н., в.н.с. ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия;

Шилов Д. Ю., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ведущий специалист ООО «МК «Семейный доктор», Москва, Россия;

Шилов С. Ю., к.м.н., м.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Daniel Eliáš, студент Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic.

Одним из наиболее широко используемых методов оценки продукции активных форм кислорода фагоцитами (АФК), связанной с ак-

тивацией НАДФН-оксидазы, является реакция люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) [1]. В качестве стимулятора фагоцитирующих клеток наиболее часто используют опсонизированный зимозан [2]. С учетом возможности прямого активирующего действия неопсонизированного зимозана через TLR2/TLR6, бета-глюкановые рецепторы (в частности, дектин-1) на продукцию АФК [1], а также на фагоцитоз через рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и к другим опсонинам [2] представляется необходимым оценить их вклад в стимулированную реакцию ЛЗХЛ. Показано и дифференцированное влияние рецепторов к Fc-фрагменту IgG и к C3b-фрагменту комплемента на хемотаксис и поглотительную активность нейтрофилов при их активации зимозаном, опсонизированным свежей и прогретой при 56 °С сывороткой крови [3].

Цель работы – исследование влияния опсо-

в течение 30 мин сыворотки крови на зимозан-индуцированную продукцию АФК лейкоцитами крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на интактных самцах нелинейных белых крыс в возрасте 4–6 месяцев. Лейкоциты крови выделяли методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США), а клетки костного мозга – промыванием полости бедренной кости. При постановке реакции ЛЗХЛ в стимулированном варианте в лунках планшета (3915 Assay Plate 96 Well Flat bottom Black Polysterene, Corning Inc. Costar) смешивали 70 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, 10 мкл натриевой соли люминола (Luminol sodium salt, Sigma, США) на растворе Хенкса (конечная концентрация 2×10^{-4} М), 10 мкл клеток (25×10^6 /мл) и 10 мкл неопсонизированного или опсонизированного аутологичной свежей или прогретой при 56 °С в течение 30 мин сывороткой крови зимозана (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). Для опсонизации зимозана смесь равных объемов суспензии зимозана (в концентрации 15000 мкг/мл) и сыворотки инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После трехкратного отмывания центрифугированием с избытком изотонического раствора NaCl, концентрацию зимозана доводили до исходной. В спонтанном варианте реакции ЛЗХЛ смешивали те же компоненты, но вместо зимозана вносили 10 мкл раствора Хенкса. Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (тип измерения – kinetic, integration time – 1000 ms, интервал – 3 мин, meas. count – 60) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU). Статистический анализ проводили с использованием методов описательной статистики и парного критерия Дункана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что внесение неопсонизированного зимозана приводит к статистически значимой и дозозависимой активации продукции АФК как лейкоцитами крови, так и клетками костного мозга в сравнении с показателями спонтанного варианта реакции ЛЗХЛ. Полученные данные подтверждают стимулирующее действие зимозана на продукцию АФК через паттернраспознающие рецепторы как классического PAMP, представляющего собой бе-

та-глюкан с бета-1-3-гликозидными связями. Установлено, что при внесении зимозана, опсонизированного прогретой при 56 °С в течение 30 мин сывороткой, продукция АФК клетками костного мозга дозозависимо повышается примерно в два раза в сравнении с неопсонизированным зимозаном в тех же концентрациях. Опсонизирующее действие прогретой сыворотки на продукцию АФК лейкоцитами крови выражено слабее и статистически значимо в сравнении с неопсонизированным зимозаном только при добавлении зимозана в самой высокой из исследованных концентраций (1500 мкг/мл). Ранее было показано, что прогревание сыворотки крови полностью отменяет ее способность стимулировать хемотаксис нейтрофилов, в то время как способность стимулировать адгезию и поглощение объектов фагоцитоза сохраняется [3]. В этой же работе методом проточной лазерной цитометрии доказано отсутствие на поверхности таких частиц зимозана С3b-компонента комплемента и наличие антител класса Ig G. Установлено, что самая высокая активация продукции АФК выявляется при добавлении к клеткам костного мозга зимозана, опсонизированного непрогретой сывороткой. Интегральные показатели хемилюминесценции примерно в 10–11 раз выше в сравнении с неопсонизированным зимозаном в тех же концентрациях ($p < 0,0001$), и в 3–6 раз выше в сравнении с теми же концентрациями зимозана, опсонизированного прогретой сывороткой ($p < 0,002$). Эта же закономерность выявляется и при исследовании продукции АФК лейкоцитами крови, но выраженность активации в сравнении с миелоцитами значительно ниже.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-44-590995, № 17-44-590404 и Администрации Пермского края, а также в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер государственной регистрации темы: 01201353248 и программы международных научных студенческих обменов International Federation of Medical Students' Associations (IFMSA) SCORE Research Exchange.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Makni-Maalej K., Chiandotto M., Hurtado-Nedelec M., Bedouhene S., Gougerot-Pocidallo M. A., Dang P. M., El-Benna J. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol.* 2013, 85(1), 92–100.

2. Morris M. R., Dewitt S., Laffafian I., Hallett M. B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. *Methods Mol. Biol.* 2003, 225, 35–46.
3. Mankovich A. R., Lee C. Y., Heinrich V. Differential effects of serum heat treatment on chemotaxis and phagocytosis by human neutrophils. *PLoS One* 2013, 8(1), e54735. doi: 10.1371/journal.pone.0054735.

INFLUENCE OF OPSONINS OF FRESH AND INACTIVATED UNDER 56 °C BLOOD SERUM ON ZYMOSAN-INDUCED PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY RAT LEUCOCYTES

© 2019 Ju. I. Shilov^{*1,2}, A. P. Godovalov², D. Ju. Shilov³,
S. Ju. Shilov^{1,2}, Daniel Eliáš⁴

**E-mail: jshilov@mail.ru*

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences* – a branch of the PFRC UB RAS, Perm, Russia;

²*Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia;*

³*LLC MC “Family Doctor”, Moscow, Russia;*

⁴*Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 01.04.2019

The production of reactive oxygen species by blood leukocytes and bone marrow cells in the reaction of luminol-dependent chemiluminescence under the action of non-opsonized zymosan and zymosan opsonized with fresh or inactivated autologous serum at 56 °C was investigated. It was established that an increase in the chemiluminescence levels takes place in all three variants of phagocyte activation, but it is most pronounced when using fresh serum.

Key words: luminol-dependent chemiluminescence, zymosan, opsonization, blood leukocytes, myelocytes, rats

Authors:

Shilov Ju. I., ✉ PhD, MD, Associate Professor, Leading Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia. **E-mail:** jshilov@mail.ru;

Godovalov A. P., PhD, MD, Leading Researcher of Central Scientific Research Laboratory and Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia;

Shilov D. Ju., PhD, MD, Allergist-Immunologist, Leading Specialist, LLC MC “Family Doctor”, Moscow, Russia;

Shilov S. Ju., PhD, MD, Junior Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Daniel Eliáš, medical student, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic.