

НЕЙТРОФИЛЫ КАК ЦИТОКИНОПРОДУЦИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

© 2019 г. А. В. Зурочка^{1,2*}, В. А. Зурочка^{1,2}, М. А. Добрынина¹,
Л. О. Фомина¹, А. И. Файзуллина¹, В. А. Гриценко³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹ФБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

³ФБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 29.08.2019

В работе изучена секреция нейтрофилами преформированных цитокинов после часовой инкубации в среде RPMI 1640. Секрецию цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что при инкубации нейтрофилов в среде RPMI 1640 в течение 1 часа в среде инкубации (супернатанте) выявляются GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-6 IL-8 и MIP-1 β , концентрация которых в супернатанте нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2–7,0 раз ($p < 0,05$ – $0,001$). Таким образом, нейтрофилы способны секретировать преформированные цитокины в среду культивирования в течение 1 часа после начала их инкубации.

Ключевые слова: нейтрофилы, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007060-1

Адрес: Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598, E-mail: av_zurochka@mail.ru

Авторы:

Зурочка А. В., д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет, Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Зурочка В. А., д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Добрынина М. А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Фомина Л. О., аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Файзуллина А. И., аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Гриценко В. А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что нейтрофилы являются клетками, способными к синтезу и секреции ряда цитокинов, получивших в свое время название нейтрофилокины [1]. В последующем было показано, что нейтрофилы способны секретировать широкий спектр цитокинов и отвечать усилением или снижением их продукции при воздействии различных факторов [2, 3].

Целью настоящего исследования явилось изучение спонтанной секреции преформированных цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучена *in vitro* спонтанная секреция нейтрофилов периферической крови 10 здоровых доноров при часовой их инкубации в среде RPMI 1640. Нейтрофилы из периферической крови доноров получали путем градиентного центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093–1,075. Все процедуры осуществлялись в пластиковой посуде. Венозная кровь, отобранная в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с литий-гепарином [4, 5], смешивалась с 6% раствором декстрана Т-500 (на изотоническом растворе хлорида натрия) в соотношении 10:1 и отстаивалась при температуре 37 °С в течение 40 минут. Плазма с лейкоцитами осторожно наплаивалась на двухфазный градиент плотности фиколла-верографина (плотность нижнего слоя 1,093–1,095, верхнего – 1,075–1,077; объем – 1,5 мл) и центрифугировалась при 1500 об./мин в течение 40 минут. Между градиентами располагалось клеточное кольцо, на 98–100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снималось дозатором и переносилось в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывалась от примеси градиентов, для чего в пробирку добавляли 2,0 мл питательной среды RPMI 1640, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 минут, а надосадочную жидкость сливали. Отмывку повторяли трижды. После отмывки клеток подсчитывали концентрацию нейтрофилов в камере Горяева и доводили ее питательной средой RPMI 1640 до $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Наличие в супернатантах клеток цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β) на приборе MAGPIX-100 (США). Контролем служила среда RPMI 1640 без клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные проведенных опытов *in vitro* свидетельствовали, что после часовой инкубации нейтрофилов в культуральной жидкости наблюдалось появление в ней ряда цитокинов, которые эффективно регистрировались использованной тест-системой для определения 17 цитокинов. В частности, выявлено, что нейтрофилы активно секретируют широкий спектр цитокинов, такие как: GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β и IL-6, концентрация которых в супернатан-

те нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640) в 1,2–7,0 раз ($p < 0,05$ – $0,001$), а к цитокинам-лидерам относились IL-8 и MIP-1 β , кратность увеличения концентрации которых против контроля составляла 23,9 и 36,7 раза соответственно ($p < 0,001$).

Эти результаты указывают на то, что в условиях часовой инкубации (явно недостаточной по времени для синтеза клетками цитокинов *de novo*) нейтрофилы активно выделяют в среду культивирования широкий спектр, очевидно преформированных, главным образом, провоспалительных цитокинов – хемокинов и ростовых факторов. Следует подчеркнуть, что эта клеточная модель позволяет изучать механизмы секреции цитокинов на живых фагоцитах, то есть не ушедших в апоптоз или гибнущих клетках, так как в условиях *in vitro* нейтрофилы живут в питательной среде около суток. При этом основные методики оценки продукции клетками цитокинов, разработанные для лимфоцитов и мононуклеаров, требуют не менее 48–72 часов инкубации, что не позволяет использовать их для изучения цитокиновой активности нейтрофилов. Кроме того, необходимо отметить, что данная методика может быть эффективно использована при исследовании цитокиновой реакции нейтрофилов на действие различных факторов, например бактерий, вирусов, лекарственных препаратов и др., в условиях максимальной их жизнеспособности, обеспечивая более глубокое понимание механизмов функционирования и регуляции фагоцитарных клеток.

ВЫВОДЫ

1. В супернатантах часовых культур нейтрофилов выявляется широкий спектр цитокинов.
2. Созданная методика оценки секреции преформированных цитокинов нейтрофилами открывает перспективы оценки функциональных и регуляторных эффектов этих клеток *in vitro*.

(Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Чукичев А.В. Регуляторные пептиды нейтрофилов (нейтрофилокины). Иммунология. 1995, 4, 40–45 [Dolgushin I. I., Zurochka A. V., Chukichev A. V. Regulatory peptides of neutrophils (neutrophilokins). Immunology. 1995, 4, 40–45].
2. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт В.В., Черкасов С.В., Гриценко В.А.

- Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 1–9. [Электронный ресурс]. [A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, E. B. Zueva, M. A. Dobrynina, V. V. Dukardt, S. V. Cherkasov, V. A. Gritsenko. The influence of synthetic peptides the active center granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on cytokine production by human peripheral blood neutrophils. Bulletin of the Orenburg scientific center UB RAS. 2015. 4: 1–9. [Electronic resource].
3. Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018, 720 с. [Zurochka A. V., Haydukov S. V., Kudryavtsev I. V., Chereshev V. A. Flowing cytometry in biomedical researches. Yekaterinburg: RIO URO RASN, 2018. 720 s.]
 4. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тотолян Арег. А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов». Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17). 4: 974–992. [Haydukov S. V., Baidun L. A., Zurochka A. V., Totolyan Areg. A. The standardized «Research of Subpopulation Structure of Lymphocytes of Peripheral Blood with Use of Flowing Cytofluorimetrov-analyzeters technology». Russian journal of immunology. 2014. Т. 8 (17). 4: 974–992].
 5. Wong L., Wilson R. D. The indentification of Fc and C3 receptors on human neutrophils. J. Immunol. Meth. 1975. 7: 69–76.

NEUTROPHILS AS THE CYTOKINE PRODUCING CELLS

© 2019 A. V. Zurochka^{1,2*}, V. A. Zurochka^{1,2}, M. A. Dobrynina¹, L. O. Fomina¹, A. I. Fayzullina¹, V. A. Gritsenko³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

³Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 29.08.2019

In work secretion by neutrophils the preforming of cytokins after an hour incubation to the RPMI 1640 environment is studied. Secretion of cytokin was defined with use of multiplex sets of the Bio-Rad company (USA) for definition of 17 cytokin (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β) on the MAGPIX-100 device (USA). It is established that at an incubation of neutrophils in the environment of RPMI 1640 within 1 hour in the environment of an incubation (supernatant) come concentration of which in a supernatant of neutrophils exceeded GM-CSF, IL-12p70, IL-17A, IL-1 β , IL-6 IL-8 and MIP-1 β reference level (RPMI-1640 environment) by 1.2–7.0 times ($p < 0.05–0.001$). Thus, neutrophils are able to secrete preformed cytokines into the culture medium for 1 hour after the start of their incubation.

Key words: neutrophils, cytokins

Authors:

Zurochka A. V., MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Phone: +79193077598, E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Zurochka V. A., MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Dobrynina M. A., Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Fomina L. O., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Fayzullina A. I., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Gritsenko V. A., MD, professor, chief researcher of FGBUN Orenburg federal research center of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia.