

## РАЗЛИЧНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ НЕЙТРОФИЛОВ

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>,  
Л. О. Фомина<sup>1</sup>, А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

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

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

<sup>3</sup>ФБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 12.07.2019. Принята: 29.08.2019

В исследовании предложены подходы к оценке уровней цитокинов нейтрофилов на основе секреции нейтрофилами преформированных цитокинов после часовой инкубации в среде RPMI 1640. Секрецию цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США), Lumiplex (США), для определения различных цитокинов на приборе MAGPIX-100 (США) и иммуноферментным анализом (ИФА). Установлено, что при инкубации нейтрофилов в среде RPMI 1640 в течение 1 часа в среде инкубации (супернатанте) выявляются различные цитокины, концентрация которых в супернатанте нейтрофилов превышала контрольный уровень (среда RPMI-1640). При добавлении к нейтрофилам различных бактерий, супернатантов бактерий, регуляторных молекул, активность секреции изменяется (стимулируется или угнетается) в зависимости от того субстрата который добавлялся в среду инкубации живых нейтрофилов. Таким образом, предложенный методический подход оценки уровней цитокинов нейтрофилов позволяет изучать механизмы регуляции цитокиновой сети этих клеток.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, цитокины, бактерии, пептиды

DOI: 10.31857/S102872210007062-3

**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

Существуют различные подходы к оценке уровней цитокинов клеток. Их можно условно разделить на два основных. Первый — оценка внутриклеточных цитокинов методами проточной цитометрии, второй — определение секретируемых нейтрофилов в супернатантах клеток или тканевых субстратах (сыворотка крови, секреты, слизь и другие жидкости. в том числе

воспалительные экссудаты). Важно, что нейтрофилы находясь практически во всех тканях организма человека, способны синтезировать и секретировать широкий спектр цитокинов, получивших название нейтрофилокины [1, 2, 3]. В то же время известно мало подходов к оценке секреции преформированных (уже синтезированных, но находящихся внутри клетки) цитокинов и методов изменения их секреторного потенциала.

**Целью** настоящего исследования явилось обобщение результатов исследования секреции преформированных цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* и при воздействии на них различных факторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Была изучена спонтанная секреция цитокинов нейтрофилами здоровых доноров при часовой инкубации клеток в среде RPMI 1640 и воздействии на нее различных факторов. Объектами исследования были нейтрофилы периферической крови, полученные путем градиентного центрифугирования плазмы крови на двойном градиенте фиколл-верографин плотностью 1,093–1,075 [4, 5]. Между градиентами располагается клеточное кольцо на 98–100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снимается пастеровской пипеткой или дозатором и переносится в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывается от примеси градиентов питательной средой RPMI 1640, добавляя в пробирку с клетками 2,0 мл питательной среды RPMI 1640 и центрифугируя при 1500 об./мин в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость сливают. Отмывку повторяют трижды; в камере Горяева подсчитывается концентрация клеток и доводится питательной средой RPMI 1640 до  $5 \cdot 10^6$  нейтрофилов в 1 мл. Наличие в супернатантах клеток цитокинов определяли с использованием мультиплексных наборов компании БиоРад (США), Luminex (США) для определения концентрации цитокинов на приборе MAGPIX-100 (США) и иммуноферментным анализом (ИФА). Контролем служила среда RPMI 1640 без клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, при часовой инкубации нейтрофилы способны секретировать в питательную среду относительно широкий спектр цитокинов, преимущественно

провоспалительной направленности. Вместе с тем установлено, что при добавлении к фагоцитам синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ, бактерий или их супернатантов уровень цитокинов в среде инкубации может существенно меняться. Так, контакт нейтрофилов с синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ, взвесями золотистых стафилококков или их супернатантами приводит к усилению секреции цитокинов эти ми клетками, тогда как при воздействии на фагоциты коагулазоотрицательных стафилококков, кишечной палочки и энтеробактерий других родов/видов и их супернатантов, напротив, наблюдается снижение уровня цитокинов в среде инкубации.

Указанные обстоятельства свидетельствует о том, что при часовой инкубации (критически короткой по времени для синтеза нейтрофилами цитокинов) даже «интактные» нейтрофилы активно выделяют в среду культивирования широкий спектр регуляторных, преимущественно, провоспалительных цитокинов – хемокинов и ростовых факторов. При этом данная функциональная активность нейтрофилов подвержена изменениям, чья направленность (стимуляция/ингибирование) зависит от воздействующих факторов. Важно, что данная клеточная модель позволяет изучать механизмы секреции цитокинов живыми нейтрофилами и их ответ на воздействие различных факторов, в том числе регуляторных молекул, бактерий и их супернатантов, в условиях максимальной жизнеспособности фагоцитов. Эта методика открывает перспективы для накопления новых знаний о характере реакции нейтрофилов при взаимодействии с повреждающими и регуляторными факторами разного генеза, что будет способствовать расшифровке механизмов их участия в развитии патологических процессов.

## ВЫВОДЫ

1. На клеточной модели *in vitro* выявлена способность нейтрофилов при часовой инкубации выделять в питательную среду ряд цитокинов и вариабельно изменять их секрецию при контакте с факторами разного генеза (синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ, золотистый стафилококк, коагулазоотрицательные стафилококки, эшерихии, энтеробактерии других видов и супернатанты микроорганизмов).

2. Разработанная и апробированная методика оценки секреции нейтрофилами цитокинов может быть использована при изучении влия-

ния *in vitro* на живые фагоциты различных регуляторных факторов, в том числе лекарственных препаратов и микроорганизмов (вирусы, бактерии, грибы).

(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 колоние-стимулирующего 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 OURO RAN. 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 RAN, 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 цитофлуориметров-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-analyzers technology». Russian journal of immunology. 2014. T. 8 (17). 4: 974–992].
5. Wong L., Wilson R. D. The identification of Fc and C3 receptors on human neutrophils. J. Immunol. Meth. 1975. 7: 69–76.

## VARIOUS APPLICATIONS OF A METHOD OF A RESEARCH OF LEVELS OF CYTOKIN OF NEUTROPHILS

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>, A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 12.07.2019. Accepted: 29.08.2019

In a research approaches to assessment of levels of cytokin of neutrophils on the basis of secretion by neutrophils the preforming of cytokins after an hour incubation are offered the RPMI 1640 environment. Secretion of cytokins was defined with use of multiplex sets of the Biorad company (USA), Luminex (USA), for definition of various cytokins on the MAGPIX-100 device (USA) and the immunoferral analysis (IFA). 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) various cytokins come to light concentration of which in a supenatant of neutrophils exceeded reference level (RPMI-1640 environment). At addition to neutrophils of various bacteria, supernatant of bacteria, regulatory molecules, the activity of secretion changes (is stimulated or suppressed) depending on that substrate which was added to the environment of an incubation of live neutrophils. Thus, the offered methodical approach of assessment of levels of cytokin of neutrophils allows to study mechanisms of regulation of cytokins network of these cages.

*Key words:* neutrophils, cytokins, bacteria, peptides

**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.