

## УЧАСТИЕ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ НЕЙТРОФИЛАМИ

Савочкина А. Ю., Абрамовских О. С., Мякишева Э. Н.,  
Тупиков В. А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Научно-исследовательский институт иммунологии  
ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия

В статье представлены результаты оценки участия коагуляционных факторов свертывания FVII, FV и FII в процессе формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, факторы свертывания FVII, FV и FII, нейтрофильные внеклеточные ловушки

**Введение.** Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [1]. Нейтрофилы обладают мощным рецепторным репертуаром, обеспечивающим связь между собой и клетками иммунной системы, а также с клетками эндотелия, эпителия и других тканей [1,2]. Нейтрофильные гранулоциты выполняют функцию киллинга патогенных микроорганизмов с помощью фагоцитоза, а также, сравнительно недавно открытым, механизмом формирования во внеклеточном пространстве сетеподобных структур – нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil extracellular traps; NETs) [2]. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) представляют собой нити ДНК с включением гистонов и содержимого цитоплазматических гранул.

Запуск формирования НВЛ может быть обусловлен многими физиологическими стимулами, к которым относят бактерии, грибы, простейшие и вирусы [3]. Образование ловушек могут индуцировать воспалительные цитокины, иммунные комплексы, активированные эндотелиальные клетки, и другие стимулы [4]. Также установлено влияние тромбоцитов на процесс формирования НВЛ [3, 5, 6]. В то время как влияние плазменных факторов

в процессе формирования НВЛ остается мало изученным.

В связи с вышесказанным целью нашего исследования стало оценить участие факторов свертывания крови FII, FV, FVII в формировании экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами, выделенными из периферической крови.

**Материалы и методы.** В исследовании принимали участие 25 условно здоровых женщин в возрасте от 18-35 лет. Критериями включения в исследование являлись: добровольное согласие на обследование; первая фаза менструального цикла; отсутствие приема лекарственных препаратов, хронических заболеваний в стадии обострения.

Материалом для исследования служили чистая фракция нейтрофилов, выделенная из периферической крови; аутологичная плазма условно здоровых женщин; плазма, дефицитная по факторам FII, FV, FVII (НПО «Ренам», Россия), активатор форбол-12-миристан-13-ацетат (Sigma-Aldrich).

**Ход эксперимента.** У обследуемых условно здоровых женщин периферическую кровь забирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с гепарином (на 1 мл крови 12-30 МЕ гепарина). Цельную кровь разводили стерильным физиологическим раствором. Градиентным центрифугированием выделяли чистую фракцию нейтрофилов [7]. Для активации клеток использовали форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) (Sigma-Aldrich) в концентрации 7,5 мМ/мл. К полученной взвеси добавляли

аутологичную плазму, плазму дефицитную по фактору II (FII), дефицитную по фактору V (FV), дефицитную по фактору VII (FVII). Все пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 30 минут. Для постановки эксперимента было использовано несколько контролей: K1-нейтрофилы, инкубированные с физиологическим раствором, K2-нейтрофилы, активированные ФМА. Для количественной оценки внеклеточных ловушек в чистой фракции нейтрофилов был использован метод индикации НВЛ при окраске по Романовскому-Гимзе [8]. Подсчет нейтрофильных гранулоцитов осуществляли при помощи световой микроскопии. Оценивали процентное содержание нейтрофилов с сегментированными ядрами, с недифференцированными ядрами и нейтрофильных внеклеточных ловушек. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с помощью пакета прикладных компьютерных программ SPSS – 17.0. Достоверность различий определяли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждения.** В ходе исследования были получены следующие результаты. В контрольной группе K1 количество нейтрофилов с сегментированным ядром составило  $81,9 \pm 1,02\%$ , с недифференцированным ядром  $11,4 \pm 0,72\%$ , НВЛ  $6,5 \pm 0,58\%$ . После индукции нейтрофилов ФМА количество нейтрофилов с сегментированным ядром снизилось до  $36,2 \pm 3,46\%$ , а количество НВЛ увеличилось и составило  $38,9 \pm 3,36\%$ . Индукция нейтрофилов ФМА совместно с плазмой условно здоровых женщин приводит к инактивации процесса формирования внеклеточных сетей, что выражается в количестве НВЛ  $5,04 \pm 0,69$ , сегментоядерных нейтрофилов –  $79,7 \pm 1,7$ , а нейтрофилов с недифференцированным ядром –  $15,2 \pm 1,63$ . При использовании плазмы, дефицитной по факторам FII, FV и FVII совместно с нейтрофилами индуцированными ФМА наблюдаются аналогичные изменения и количество НВЛ составило  $10,9 \pm 1,4$ ,  $6,84 \pm 1,1$  и  $8,1 \pm 0,93$ , соответственно. Таким образом, плазма крови независимо от присутствия факторов свертывания FII, FV и FVII, способна блокировать образование внеклеточных сетей нейтрофилами периферической крови.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтаидзе Л. В., Ковалева С. В., Евглевский А. А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология 2015; 36(4): 257-265 [Nesterova I. V., Kolesnikova N. In. Chudilova G. A., Lomtadze L. V., Kovaleva S. V., A. A. Evglevsky Neutrophilic granulocytes: a new look at "old players" on the immunological field// Immunology 2015; 36(4): 257-265]

2. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН, 2009. 208с. [Dolgushin I. I., Andreeva Yu. S., Savochkina A. Yu., Neutrophil extracellular traps and methods of assessing functional status of neutrophils. M.: Publishing house of Russian Academy of medical Sciences, 2009. 208.]
3. Воробьева Н. В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии (обзор) / Н. В. Воробьева, Б. В. Пинегин // Биохимия. 2014. Т. 79. № 12. С. 1580-1591. [Vorobyeva N. V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, role in health and disease / N. V. Vorobyeva, B. V. Pinegin // Biochemistry. 2014. T. 79. No. 12. Pp. 1580-1591.]
4. Андрюков Б. Г., Сомова Л. М., Дробот Е. И., Матосова Е. В. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий// Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017 № 1(68) С. 4-18. [Andryukov B. G., Somova L. M., Drobot E. I., Matrosova V. E. Defensive strategies of neutrophilic granulocytes against pathogenic bacteria//Health. Medical ecology. Science. 2017 No. 1(68) Pp. 4-18.]
5. Зубкова Ж. В., Новикова И. А., Железко В. В. Влияние тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей у пациентов с иммунокомплексной патологией// Проблемы здоровья и экологии. 2016. № 3(49) С. 66-70 Zubkova Zh. V., Novikova IA, Zhelezko V. V. The role of platelets in formation of neutrophil extracellular traps in patients with immunocomplex pathology // Problems of health and ecology. 2016. № 3 (49) С. 66-70
6. Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps. //Frontiers in Immunology. 2016
7. Пат. № 2431836 Рос. Федерация Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови / И. И. Долгушин, А. И. Рыжкова, А. Ю. Савочкина, Ю. С. Андреева (Российская Федерация). – № 2010105891; заявл. 18.02.2010; опубл. 20.10.2011, Бюл. № 29. – 5с. Pat. No. 2431836 Ros. Federation Method for the isolation of neutrophilic granulocytes from peripheral blood. Dolgushin, A. I. Ryzhkov, A. Yu. Savochkina, Yu. S. Andreeva (Russian Federation). – No. 2010105891; Claimed. 18.02.2010; Publ. 20.10.2011, Bul. No. 29. 5с
8. Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: дис. ... д-ра мед. наук / А. Ю. Савочкина. – Челябинск, 2012. – 221 с..

## PARTICIPATION OF PLASMA FACTORS OF FOLDING IN THE COURSE OF FORMATION THE EKSTRATSELYULYAR OF NETWORKS NEUTROPHILS

Savochkina A. Yu, Abramovskih O. S., Myakisheva E. N., Tupikov V. A.

FSBEI HE "South Ural State Medical University" MOH Russia, Research Institute of Immunology  
FSBEI HE "South Ural State Medical University" MOH Russia, Chelyabinsk, Russia

The article presents the results of the assessment of the role of clotting factors FVII, FV, FII in formation of extracellular traps by neutrophils.

*Key words:* Neutrophils, clotting factors FVII, FV, FII, Neutrophil extracellular traps

---

---

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА СПОРТСМЕНОВ АЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА (БОРЦОВ И БОКСЕРОВ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ СПОРТИВНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Сашенков С. Л., Журило О. В., Мельников И. Ю.,  
Колупаев А. В., Комарова И. А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Челябинск, Россия

Исследование показателей крови и анализ их изменений у борцов и боксеров позволили выявить особенности популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов у борцов и боксеров различной квалификации. У спортсменов силовых видов спорта с анаэробной направленностью обмена (борцов и боксеров) установлено достоверное снижение общей популяции Т-лимфоцитов, за счет уменьшения в циркуляции основных субпопуляций Т-клеток: Т-хелперов и Т-цитотоксических. Также зафиксировано снижение количества клеток, несущих рецепторы адгезии (CD 11b), числа В-лимфоцитов и клеток несущих маркеры готовности к апоптозу (CD95), на фоне роста клеток с маркерами ранней позитивной активации лимфоцитов (CD25). Повышение количества клеток с рецепторами к интерлейкину-2 (CD 25) с параллельным снижением количества предшественников гемопоэтических клеток и основных субпопуляций лимфоцитов (Т, В-лимфоцитов) является отражением негативного воздействия на иммунную систему интенсивного скоростно-силового анаэробного режима и может проявляться развитием иммунодефицитных состояний у данной категории спортсменов. Иммунный статус спортсменов, занимающихся ациклическими видами спорта характеризуется ярко выраженными цитопеническими реакциями со стороны относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов, как Т-хелперов, так и Т-цитотоксических лимфоцитов, уровней CD 16 и CD56 позитивных клеток, относящихся к факторам врожденного иммунитета, В-лимфоцитов (CD20), в сравнении с группами лыжников и пловцов, что отражает снижение интенсивности иммунопоэза при анаэробном типе энергообеспечения и является фак-тором, значимо влияющим на качество иммунного ответа и механизмы Т и В-клеточной кооперации.

*Ключевые слова:* иммунология, спортивная физиология; периферическая кровь, физические нагрузки, спортивная квалификация

**Введение.** При ситуационных (нестандартных) собственно-силовых ациклических видах спорта (единоборствах) преобладающим источником энергии являются процессы анаэ-

робной направленности. Суммарные энергозатраты, кислородный запрос и кислородный долг при данных видах физических нагрузок ниже, чем в циклических видах спорта,