

ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ СЕКРЕТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

© 2018 г. И. В. Самусева

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Поступила: 04.05.2018. Принята: 11.06.2018

В работе представлены результаты по анализу динамики фагоцитарной реакции нейтрофилов и образования ими внеклеточных сетей ДНК в секретах урогенитального тракта и в выделенной чистой фракции нейтрофильных гранулоцитов в присутствии клеточных активаторов, в зависимости от фазы менструального цикла. Было установлено, что функциональный статус нейтрофилов условно здоровых женщин во вторую половину менструального цикла выше в сравнении с первой. Вероятно это связано с повышенной реактивностью нейтрофилов при более выраженном женском гормональном профиле, который наблюдается во вторую фазу менструального цикла и при беременности, что по-видимому, играет важную роль в обеспечении защиты урогенитального тракта беременной женщины и плода.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фагоцитоз, внеклеточные сети ДНК, НСТ-тест

DOI: 10.31857/S102872210002421-8

Адрес: 454092 Челябинск, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Самусева Ирина Владимировна.

Тел.: +79227344234. E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

Авторы:

Самусева И. В., м.н.с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками врожденного иммунитета [1], их основной функцией является уничтожение патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и паразиты, а так же предотвращение их распространения в организме. Это самые многочисленные, но короткоживущие клетки белой крови. Они являются главными в разрушении микробицидных компонентов, а также вирусов [2]. Нейтрофилы оснащены богатым набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцировано реагировать на малейшие изменения окружающей среды. Они первыми приходят в очаг воспаления, где проявляют разнообразные виды активности [3]. Нейтрофилы могут находиться в двух функциональных состо-

яниях: в редокс—исходном и праймированном. Известно, что активация нейтрофилов периферической крови происходит на фоне праймированного состояния [4]. Праймирующий стимул вызывает метаболическую перестройку, приводящую к активации клетки, следствием его влияния является усиление ответа на последующую активацию. Представление о механизме праймирования фагоцитарной реакции и респираторного взрыва нейтрофилов в настоящее время находится в стадии формирования [5]. Предполагается, что праймирование реализуется в результате перекрестного взаимодействия сигнальных путей, задействованных в первичной сборке и активации NADPH оксидазы [4, 5]. В активированном состоянии нейтрофил может оказывать свое действие на объект, вызвавший его активацию, различными способами: фагоцитировать и уничтожать его в фаголизосомах или выделять наружу бактерицидные продукты, которые представляют собой содержимое гранул [1, 3, 6].

Открытие нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и установление их антимикроб-

ного эффекта как важнейшего звена врожденного иммунитета, безусловно, явилось началом нового этапа в исследовании функций нейтрофильных гранулоцитов. Формирование внеклеточных ловушек может осуществляться только активированными нейтрофилами. Эффект антимикробных веществ во внеклеточном пространстве усиливается в структурах НВЛ [7, 8].

Несмотря на многочисленные исследования нейтрофильных гранулоцитов и НВЛ многие вопросы остаются нераскрытыми и по сегодняшний день.

Исходя из этого **целью** данного исследования было изучить влияние клеточных активаторов микробной и немикробной природы на динамику функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов урогенитального тракта, и нейтрофилов выделенных из периферической крови женщин *in vitro* в первую и вторую фазу менструального цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (г. Челябинск). Были обследованы 40 здоровых не беременных женщин. Средний возраст составил $26,5 \pm 3,3$ года. У всех доноров в первую и вторую фазы менструального цикла была забрана периферическая венозная кровь, цервикальный и вагинальный секреты.

Критериями включения являлись добровольное согласие на обследование, оформленное в письменном виде. Отсутствие отклонений в нормативных показателях общего гематологического анализа крови, выраженной эндокринной и соматической патологии. Все женщины, принявшие участие в данном эксперименте подтверждали отсутствие приема гормональных препаратов, а также имели концентрации прогестерона, эстрадиола, лютеинизирующего гормона в сыворотке крови в пределах нормального репродуктивного диапазона. У всех женщин проводилось микробиологическое исследование для определения состава микрофлоры половых путей. Методом световой иммерсионной микроскопии подвергались мазки, окрашенные метиленовым синим и по Граму.

Для получения чистой фракции нейтрофилов периферическую венозную кровь забирали у женщин из локтевой вены, добавляли гепарин из расчета 10 ЕД («Гедеон-Рихтер», Hungary) на 10 мл крови. Затем к 2 мл гепаринизированной венозной крови добавляли 3 мл стериль-

ного физиологического раствора (0,9% раствор NaCl), полученную смесь наслаивали на градиент плотности стерильных растворов фиколаверографина (Pharmacia, Sweden; Spofa, CSSR). Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,075–1,077, нижнего – 1,093–1,095. Каждый градиент использовали в объеме 2 мл. Через 40 минут центрифугирования при 1500 об./мин., температуре 4°C, на границе между градиентами образуется кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, а на границе между 1,077 градиентом и плазмой крови – кольцо мононуклеаров. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные пластиковые пробирки и отмывали от градиента стерильным раствором Хенкса путём центрифугирования при 1500 об./мин., 4°C, два раза по 7 минут. Клеточную взвесь стандартизовали до концентрации 5×10^6 клеток/мл. И помещали в агарозный гель.

Забор урогенитальных секретов осуществлялся с помощью специальной градуированной пипетки в первую и вторую фазы менструального цикла. Полученный материал помещали в 1,0 мл стерильного раствора Хенкса и тщательно суспензировали.

Далее полученные аликвоты инкубировали с раствором Хенкса (контроль), клеточными активаторами 4-форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и пирогеналом.

Оценивали: НСТ-тест, фагоцитарную активность нейтрофилов, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, процент внеклеточных сетей ДНК. Для оценки функционального статуса нейтрофилов цервикального и вагинального секретов подсчет проводили на 30, 60, 120 минуте. Для нейтрофилов, выделенных из чистой фракции и помещенных в агарозный гель и раствор Хенкса подсчет осуществляли на 5, 10, 20, 30, 60, 120 минутах инкубации.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica for Windows (v.10.0; Statsoft Inc.). При обработке полученных данных использовали методы описательной статистики и дисперсионный анализ (ANOVA). Парные сравнения в рамках дисперсионного комплекса проводили с использованием критерия достоверно значимой разности Тьюки. Эффекты и межгрупповые различия в дисперсионном анализе считали значимыми при $p < 0,05$. Полученные данные представлены в виде средних значений и их 95%-ных доверительных интервалов (95%ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования было установлено, что нейтрофильные гранулоциты различных биологических жидкостей не одинаково отвечают на индукцию клеточными активаторами и имеют значимые различия степени проявления функциональной активности у женщин во вторую фазу менструального цикла по сравнению с первой фазой. У нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови женщин на протяжении менструального цикла происходит значимое увеличение показателей фагоцитарной функции, на 3,2% выше чем в первой фазе менструального цикла, с одновременным повышением способности генерировать активные формы кислорода (АФК) – НСТ-тест на 6,1%. Способность к формированию внеклеточных сетей не имела значимых различий на протяжении оварияльного цикла.

Нейтрофилы цервикального секрета у женщин во вторую фазу менструального цикла обладают наиболее высокой внутриклеточной бактерицидностью, фагоцитарной функцией, экспрессией внеклеточной ДНК и значимо различаются от этих показателей в первую фазу.

У полиморфноядерных нейтрофилов вагинального секрета не были выявлены значимые различия между способностью к фагоцитозу, показателями НСТ-теста и процентном содержании внеклеточных сетей в первую и вторую фазу менструального цикла. Таким образом можно сделать заключение о том что нейтрофилы вагинального секрета незначительно изменяют свой функциональный статус на протяжении всего оварияльного цикла.

Значимых различий от природы клеточного индуктора выявлено не было.

Задачей следующего этапа нашего исследования было оценить влияние временного фактора на кинетику ферментативных реакций внутриклеточного кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов инкубированных в присутствии и отсутствии клеточных индукторов в тестах спонтанного и индуцированного восстановления нитросинего тетразолия, на фагоцитарную функцию и на способность нейтрофильных гранулоцитов экспрессировать экстрацеллюлярную ДНК.

Установлено, что нейтрофильные гранулоциты в зависимости от присутствия клеточного активатора имеют различную динамику ферментативной активности АФК комплекса. Для нейтрофилов, инкубированных без клеточных

активаторов характерно наличие подъема окислительной активности к 60 минуте инкубации. У нейтрофильных гранулоцитов инкубированных с клеточными активаторами максимальное значение их внутриклеточной бактерицидной активности наблюдается уже в первые 20 минут инкубации, повышенная активность сохраняется до 30 минуты, при этом значения показателей НСТ-теста, отражающие активность их ферментов в 1,7–2,2 раза значимо превосходят значения, зарегистрированные при инкубации нейтрофильных гранулоцитов со стерильным раствором Хенкса.

Было установлено, что для максимально эффективной реализации фагоцитарной функции интактными нейтрофильными гранулоцитами необходимо определенное время, а именно 60 минут для функциональной активации интактных клеток и перехода их в стадию активного поглощения микроорганизмов. У нейтрофилов, предварительно стимулированных растворимыми клеточными активаторами пирогеналом и ФМА, наблюдается сдвиг увеличения фагоцитарной функции в сторону уменьшения времени, необходимого для клеточной активации до 30 минут в присутствии клеточного индуктора пирогенал и 20 минут в при активации ФМА.

Минимальное время необходимое для кислородзависимого формирования экстрацеллюлярных сетей составляет не менее 20 минут. Максимальное процентное содержание внеклеточных сетей в исследуемых образцах наблюдалось на 120 минуте инкубации в независимости от природы клеточного индуктора во вторую фазу менструального цикла и достигало 76%. В контрольных образцах их доля не превышала 3% в первую фазу и 5% во вторую фазу оварияльного цикла на протяжении всего времени инкубации.

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе полученных данных, можно сделать заключение о том, что наиболее выраженный функциональный статус наблюдается у нейтрофилов цервикального секрета во вторую фазу менструального цикла. Вероятно это связано с повышенной реактивностью нейтрофилов при более выраженном женском гормональном профиле [9], который наблюдается во вторую фазу менструального цикла и при беременности [1, 7, 9], что по-видимому, играет важную роль в обеспечении защиты урогенитального тракта беременной женщины и плода. Также следу-

ет отметить, что предварительная инкубация с клеточными индукторами приводит нейтрофил в функционально активированное состояние. Вступающие в фагоцитоз обработанные растворами ФМА и пирогеналом нейтрофильные гранулоциты обладают более высокими показателями НСТ-теста и максимальные значения наблюдаются в первые 30 минут от начала фагоцитарной реакции. Это можно объяснить тем, что сборка НАДФ-оксидазного комплекса, по-видимому, происходит до контакта с чужеродным агентом [10], что обеспечивает нейтрофилу возможность не только более быстрой нейтрализации объекта, но и осуществление «респираторного взрыва» со значительно большей скоростью и эффективностью [11].

В отсутствие клеточных индукторов активного роста внеклеточных нитей ДНК не происходит, тогда как показатели НСТ-теста и фагоцитарная функция возрастает и достигает своего пика к 60 минуте инкубации. Это можно объяснить тем, что для формирования внеклеточных сетей нейтрофильными гранулоцитами АФК являются необходимыми, но не достаточными пусковыми молекулами [7].

В присутствии клеточных индукторов у нейтрофилов выделенных из крови женщин в первой и второй половине овариального цикла и погруженных в агарозный гель и раствор Хенкса процентное содержание внеклеточных сетей и процент клеток с фагоцитарной реакцией увеличивался на протяжении всего временного отрезка, тогда как максимальные значения НСТ-теста нейтрофилов наблюдается в течение первых 30 минут. Это объясняется тем, что агарозный гель обладает упорядоченной пространственной структурой, которая препятствует разрушению внеклеточных нитей ДНК нейтрофилов под воздействием ферментов, высвобождающихся в процессе формирования сетеподобных формаций. Увеличение процентного числа нейтрофилов, способных поглощать частицы латекса по-видимому происходит за счет того, что при подсчете в первые 30 минут инкубации в препарате присутствует большее количество нейтрофильных гранулоцитов с сегментированным ядром, таким образом в присутствии клеточного активатора фагоцитарная активность (ФА) на 30 минуте инкубации составляет в среднем 50–57%, а число внеклеточных ловушек не превышает 15%, при этом в препарате присутствуют: нейтрофилы с сегментированным ядром не поглотившие частички латекса и нейтрофи-

лы с однородным распределением хроматина (предшественники экстрацеллюлярных сетей, их процентное соотношение колебалось в пределах 15–25%). При учете аналогичных структур на 120 минуте инкубации мы наблюдаем ФА – 63–67% и внеклеточные сети ДНК – 63–76%. Процент увеличения внеклеточных сетеподобных структур происходит за счет выброса нитей ДНК во внеклеточное пространство нейтрофилами утратившими сегментацию ядра. В силу того, что процентная доля к 120 минуте инкубации увеличилась более чем на 25%, то можно говорить о том, что при активации сегментоядерные нейтрофилы после 30 минуты инкубации продолжали идти по пути высвобождения внеклеточных ДНК ловушек и утрате ядерной сегментации, превращаясь в клетки способные к внеклеточному высвобождению сетей.

Увеличение процента нейтрофилов с фагоцитарной реакцией по-видимому наблюдается за счет того, что нейтрофильные гранулоциты, не поглотившие частички латекса, возможно уже начали реализовывать свой бактерицидный потенциал по пути образования внеклеточных ловушек, теряя свою ядерную сегментацию и тем самым сокращая процент сегментоядерных нейтрофилов. Таким образом увеличивая ФА нейтрофилов при подсчете. Наряду с этим в зарубежных источниках выдвинуто предположение, что нейтрофильные гранулоциты не способные к однородному внутриклеточному распределению хроматина и к завершению фагоцитозу, обладающие низкой ферментативной активностью, возможно имеют более медленную погложительную способность [12]. Все это позволяет предположить о возможной функциональной гетерогенности клеточной популяции нейтрофилов которую отмечают и другие исследователи [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2007; 4: 93–100. [Semenov B. F., Zverev V. V. The concept of creating a rapid immunological defense against pathogens. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2007; 4: 93–100].
2. Herant E. Mechanisms of neutrophil phagocytosis. Journal of cell science 2003; 19: 45–50.
3. Скулачев В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло, Соросовский образовательный журнал 1996; 2: 23–27 [Skulachev V. P. Oxygen in a living cell: good and evil, Soros Educational Journal 1996; 2: 23–27].

4. Halliwell B., Gutteridge J., Modulating A. Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance/ Halliwell B. *Biology* 1998; 1 (45): 734–740.
5. Гольдштейн Н. И. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды. *Биохимия* 2002; 67: 194–204. [Goldstein N. I. Active forms of oxygen as vital components of the air environment. *Biochemistry* 2002; 67: 194–204].
6. Delanty N., Dichter M. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurologica Scandinavica* 1998; 9: 145–153.
7. Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: диссертация доктора медицинской наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2012.— 212с. [Savochkina A. Yu. Neutrophilic extracellular traps: mechanisms of formation, methods of detection, biological role. dis. MD, PhD, Chelyabinsk state medical Academy.— Chelyabinsk, 2012.—212 p.]
8. Brinkmann V., Zychlinsky V. Why neutrophils die to, make NETs. *Nature* 2007; 5: 577–582.
9. Смирнова Т. Г. Влияние женских половых стероидных гормонов на механизм внутри—и внеклеточной бактерицидности фагоцитирующих клеток: диссертация кандидата биологических наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2014.—201с. [Smirnova T. G. The influence of female sex steroid hormones on the mechanisms of intra— and extracellular bacteriacidal activity of phagocytic cells: thesis PhD, Chelyabinsk state medical Academy.— Chelyabinsk, 2014.— 201p.]
10. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов. *Биохимия* 2002;3: 281–292. [Turpaev K. T. Active forms of oxygen and regulation of gene expression. *Biochemistry* 2002;3:281–292].
11. Mc.Cord J. M. Prevention of Neutrophil-Mediated Hepatic Ischemia. Reperfusion Injury by Superoxide Dismutase and Catalase Derivatives. *The journal of pharmacology* 1995; 34 (1): 231–243.
12. Oberley T. D., Toyokuni S., Szweda L. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5–6): 695–703.
13. Beyrau M., Bodkin J. V, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol* 2012; 2(11): 120–134.
14. Маркова В. А. Сравнительный анализ функциональных свойств нейтрофильных гранулоцитов периферической крови и мукозальных секретов у здоровых мужчин и женщин: диссертация кандидата биологических наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2014.—136 с. [Markova V. A. Comparative analysis of functional properties of neutrophilic granulocytes of peripheral blood and mucosal secretions in healthy men and women: thesis PhD, Chelyabinsk state medical Academy.— Chelyabinsk, 2014.—136 p.]

DYNAMICS OF THE FUNCTIONAL STATUS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF UROGENITAL SECRETS AND NEUTROPHILES ALLOCATED FROM THE PERIPHERAL BLOOD OF WOMEN IN VARIOUS PHASE OF THE MENSTRUAL CYCLE

© 2018 I. V. Samuseva

FSBEI of higher professional education “South Ural state medical University” Ministry of healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Received: 04.05.2018. **Accepted:** 11.06.2018

The paper presents the results of analysis of the dynamics of the phagocytic reaction of neutrophils and the formation of extracellular DNA networks in the secrets of the urogenital tract and in the isolated pure fraction of neutrophilic granulocytes in the presence of cellular activators, depending on the phase of the menstrual cycle. It was found that the functional status of neutrophils in conditionally healthy women in the second half of the menstrual cycle is higher in comparison with the first. This is probably due to increased reactivity of neutrophils with a more pronounced female hormonal profile, which is observed in the second phase of the menstrual cycle and during pregnancy, which apparently plays an important role in protecting the urogenital tract of the pregnant woman and fetus.

Key words: neutrophilic granulocytes, phagocytosis, extracellular DNA networks, HCT test

Authors:

Samuseva I. V., ✉ Junior Researcher, Research Institute of Immunology, Federal state budgetary educational institution of higher professional education “South Ural state medical University” Ministry of healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. 454092 Chelyabinsk, FSBEI of higher professional education “South Ural state medical University” Ministry of healthcare of the Russian Federation. Phone: +79227344234. **E-mail:** i.v.samuseva@yandex.ru.