

## СЕКРЕТОРНЫЕ ПРОДУКТЫ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ДОНОРОВ

И.Е. ТРЕТЬЯКОВА, А.Л. ЦУЦИЕВА, В.А. ГАДИЕВА

*ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
ул. Пушкинская 40, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия-Алания, Россия, 362019*

**Аннотация.** Вопрос об участии нейтрофилов в иммунных реакциях и их взаимосвязи с другими иммунными клетками является одной из актуальных проблем современной иммунологии. Нейтрофилы являются не только фагоцитирующими клетками, но и выполняют секреторную функцию. Выделяя биологически активные продукты нейтрофилы способны регулировать функции иммунокомпетентных клеток. Функциональные возможности нейтрофилов раскрываются после их стимуляции. Изучение секреторных продуктов нейтрофилов, полученных после стимуляции клеток частицами латекса, может иметь большое значение для понимания регулирующего влияния полиморфно-ядерных лейкоцитов на различные клетки, в том числе на иммунокомпетентные. Целью настоящего исследования являлась оценка секреторной функции нейтрофилов крови доноров. Для решения поставленной задачи нами были определены биохимический и цитокиновый состав, а также иммунотропная активность супернатантов неактивированных и активированных латексом нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров.

Установлено, что супернатанты неактивированных нейтрофилов крови доноров содержат продукты перекисного окисления липидов, антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазу, каталазу), протеазы, лизоцим, провоспалительные цитокины (ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО $\alpha$ ). Стимуляция нейтрофилов крови доноров частицами латекса приводит к росту уровней секреции перечисленных компонентов. Анализ иммунотропной активности секреторных продуктов нейтрофилов показал, что супернатанты активированных латексом нейтрофилов крови доноров обладают моноцитстимулирующей активностью, супернатанты неактивированных нейтрофилов крови доноров обладают моноцитсупрессирующей активностью.

**Ключевые слова:** секреторные продукты неактивированных и активированных нейтрофилов крови доноров.

## SECRETORY PRODUCTS OF NEUTROPHILS OF BLOOD DONORS

I.E. TRETYAKOVA, A.L. TSUTSIEVA, V.A. GADIEVA

*North Osetian State Medical Academy (NOSMA),  
Pushkinskaya street, 40, Vladikavkaz, the Republic of North-Ossetia-Alania, Russia, 362019*

**Abstract.** A question of the participation of neutrophils in immune reactions and their relationship with other immune cells is one of the urgent problems of modern immunology. The neutrophils are not only phagocytic cells, but they have a secretory function. Separating biologically active products are able to regulate neutrophil functions of immune cells. The functionality of neutrophils is revealed after their stimulation. The study of neutrophil secretory products obtained after stimulation of the cells latex particles, can be of great importance for the understanding of the regulatory impact of polymorpho-nuclear leukocytes to various cells, including immune-competent. The purpose of this study was to evaluate the secretory function of blood neutrophils donors. To solve this problem, the authors have determined the biochemical and cytokine composition and immune-tropic activity of the supernatants of activated and unactivated latex neutrophils isolated from peripheral blood of donors. The authors found that supernatants unactivated donor blood neutrophils contain the products of lipid peroxidation, antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase), protease, lysozyme, pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF). Stimulation of neutrophils blood donors of latex particles leads to an increase in the levels of secretion of the listed ingredients. Analysis of the immune-tropic activity of secretory products of neutrophils showed that the supernatants of activated latex neutrophils blood donors have monosaccharose activity; the supernatants of non-activated neutrophils blood donors have monocytopenia activity.

**Key words:** Secretory products of unactivated and activated neutrophils blood donors.

Вопрос об участии нейтрофилов в иммунных реакциях и их взаимосвязи с другими иммунными клетками является одной из актуальных проблем современной иммунологии [3, 8, 9]. Нейтрофилы являются не только фагоцитирующими клетками, но и выполняют секреторную функцию. Выделяя биологически активные продукты нейтрофилы способны регулировать функции иммунокомпетентных клеток [3, 8].

### Библиографическая ссылка:

Третьякова И.Е., Цуциева А.Л., Гадиева В.А. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №3. Публикация 2-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-3/5121.pdf> (дата обращения: 01.09.2015). DOI: 10.12737/13070

Функциональные возможности нейтрофилов раскрываются после их стимуляции. Изучение секреторных продуктов нейтрофилов, полученных после стимуляции клеток частицами латекса, может иметь большое значение для понимания регулирующего влияния *полиморфно-ядерных лейкоцитов* (ПМЯЛ) на различные клетки, в том числе на иммунокомпетентные.

**Цель исследования** – оценка *секреторной функции нейтрофилов* (СФН) крови доноров. Для решения поставленной задачи нами были определены биохимический и цитокиновый состав, а также иммунотропная активность супернатантов неактивированных и активированных латексом нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров.

**Материалы и методы исследования.** Супернатанты неактивированных и активированных нейтрофилов крови доноров выделяли с помощью метода И.И. Долгушина и соавт. [2]. В качестве индуктора секреции нейтрофилов использовали частицы полистирольного монодисперсного латекса диаметром 1,7 мкм, полученного из НИИ синтетического каучука (Санкт-Петербург).

При изучении биохимического состава продуктов секреции ПМЯЛ мы исследовали в супернатантах неактивированных и активированных латексом нейтрофилов доноров содержание продуктов *перекисного окисления липидов* (ПОЛ), антиоксидантных ферментов *супероксиддисмутазы* (СОД), каталазы; протеаз, лизоцима [3, 4, 6, 7].

При оценке цитокинового состава супернатантов нейтрофилов определяли наличие в них провоспалительных цитокинов: *интерлейкинов* (ИЛ) 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 8, *фактора некроза опухоли  $\alpha$*  (ФНО $\alpha$ ). С этой целью использовали соответствующие тест-системы ТОО «Цитокины» (Санкт-Петербург).

Тестирование иммунотропной активности секреторных продуктов нейтрофилов проводили на моноцитах, выделенных из периферической крови доноров и выполняющих роль клеток-мишеней. Моноцитстимулирующее или моноцитсупрессорное действие продуктов секреции гранулоцитов оценивали по их влиянию на эффекторные функции (фагоцитарную и лизосомальную) клеток-мишеней. Модулирующее влияние секреторных продуктов нейтрофилов на моноциты доноров оценивали с помощью *индекса сдвига* (ИС)-стимуляции или супрессии, который рассчитывали как отношение значения показателя функциональной активности мононуклеарных фагоцитов в присутствии супернатантов гранулоцитов к значению функциональной активности мононуклеарных фагоцитов, инкубированных в растворе Хенкса. ИС менее 1,0 свидетельствовал о супрессорной, а ИС более 1,0 – о стимулирующей активности продуктов секреции ПМЯЛ в отношении клеток-мишеней.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с использованием пакетов статистических программ «STADIA 6.3», «Statistica for Windows 5.0».

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования показали, что нейтрофилы, полученные из периферической крови доноров и инкубированные в растворе Хенкса при температуре 37 $^{\circ}$ С в течение часа, выделяют продукты ПОЛ, антиоксидантные ферменты (СОД, каталазу), протеазы, лизоцим, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО $\alpha$  (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Биохимический состав супернатантов неактивированных и активированных нейтрофилов крови доноров (M $\pm$ m)**

Исследуемые компоненты	Супернатанты неактивированных нейтрофилов	Супернатанты активированных латексом нейтрофилов
Продукты ПОЛ (индекс окисления E232/E220), е.и.о.	0,5 $\pm$ 0,01 (n=12)	0,8 $\pm$ 0,01 (n=16) P=0,0001
Продукты ПОЛ (индекс окисления E278/E220), е.и.о.	0,1 $\pm$ 0,01 (n=12)	0,3 $\pm$ 0,01 (n=16) P=0,0001
СОД, ед/мл	0,3 $\pm$ 0,01 (n=10)	0,7 $\pm$ 0,02 (n=12) P=0,0001
Каталаза, мкат/л	4,8 $\pm$ 0,18 (n=12)	9,6 $\pm$ 0,17 (n=12) P=0,0001
Протеолитическая активность, ЕДопп на 1 мг белка	0,1 $\pm$ 0,01 (n=10)	0,3 $\pm$ 0,02 (n=10) P=0,0001
Лизоцим, мкг/мл	1,2 $\pm$ 0,05 (n=10)	2,5 $\pm$ 0,09 (n=15) P=0,0001

Примечание: P – достоверность различий показателей по отношению к супернатантам неактивированных нейтрофилов крови доноров. Использован критерий Вилкоксона

**Библиографическая ссылка:**

Третьякова И.Е., Пуциева А.Л., Гадиева В.А. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №3. Публикация 2-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-3/5121.pdf> (дата обращения: 01.09.2015). DOI: 10.12737/13070

**Цитокиновый состав супернатантов неактивированных и активированных нейтрофилов крови доноров ( $M \pm m$ )**

Цитокины	Супернатанты неактивированных нейтрофилов ( $n=10$ )	Супернатанты активированных латексом нейтрофилов ( $n=10$ )
ИЛ-1 $\alpha$ , пг/мл	51,3 $\pm$ 3,5	53,5 $\pm$ 6,1 -
ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл	12,6 $\pm$ 1,4	24,8 $\pm$ 14,1 -
ИЛ-8, пг/мл	48,8 $\pm$ 23,4	101,7 $\pm$ 42,3 -
ФНО $\alpha$ , пг/мл	4,6 $\pm$ 0,27	6,2 $\pm$ 0,85 -

Примечание:  $P$  – достоверность различий показателей по отношению к супернатантам неактивированных нейтрофилов крови доноров. Использован критерий Вилкоксона

Появление этих продуктов в супернатантах неактивированных нейтрофилов (СНН) обусловлено, вероятно, секреторной дегрануляцией клеток, происходящей при инкубации нейтрофилов *in vitro* не в физиологических условиях. В связи с этим обозначение «супернатанты неактивированных нейтрофилов» принято нами условно и подразумевает секреторные продукты нейтрофилов, которые были выделены без использования индукторов секреции клеток. Уровни изучаемых компонентов в СНН доноров достоверно были ниже их содержания в продуктах секреции, выделенных после активации нейтрофилов микросферами латекса.

В стимулированных нейтрофилах усиливались метаболические процессы. Результаты исследования биохимического и цитокинового состава секреторных продуктов активированных латексом нейтрофилов крови доноров показали следующее (табл. 1, 2). При фагоцитозе гранулоцитами частиц латекса отмечался выраженный респираторный взрыв. Нейтрофилы, захватывая частицы латекса, потребляли кислород, который восстанавливался с помощью НАДФН<sup>+</sup> с образованием супероксида  $O_2^-$ . Супероксидный анион  $O_2^-$  инициировал свободнорадикальные цепные реакции, которые приводили к ПОЛ. Токсичность активных форм кислорода трансформировалась через вторичные оксиметаболиты, закрепляющие потенциальную биоцидность короткоживущих свободных радикалов [5]. При анализе доступной нам литературы мы обнаружили, что активные формы кислорода и метаболиты не только обладают биоцидным потенциалом, но и могут приводить к модификации тех или иных белковых структур и влиять на функции других клеток, в том числе макрофагов и лимфоцитов [1]. В ходе фагоцитоза НАДФН<sup>+</sup> становится частью внутренней поверхности фагосомы, и продукты активности этого фермента выделяются в фагосому, где и оказывают свое бактерицидное действие [5]. В ответ на рост уровня  $O_2^-$  в фагосоме с целью его обезвреживания из митохондрий поступает антиоксидантный фермент СОД, который катализирует образование  $H_2O_2$  при дисмутации  $O_2^-$  [5], опосредованно влияя на рост бактерицидной функции нейтрофилов. Установлено, что  $H_2O_2$  обладает выраженными бактерицидными свойствами [5]. При росте количества  $H_2O_2$  увеличивается содержание в клетке каталазы, разлагающей  $H_2O_2$ . Появление в супернатантах изучаемых компонентов обусловлено секреторной дегрануляцией, происходящей при активации нейтрофилов. Кроме того, в супернатантах активированных латексом нейтрофилов крови доноров в результате секреторной дегрануляции обнаружен достоверный по сравнению с СНН рост уровней протеолитических ферментов и лизоцима, обладающих бактерицидными свойствами.

Анализ содержания провоспалительных цитокинов в секреторных продуктах активированных нейтрофилов крови доноров показал следующее (табл. 2). После активации нейтрофилов микросферами латекса отмечена тенденция к росту уровней секреции преформированных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО $\alpha$ ).

При исследовании влияния супернатантов неактивированных и активированных латексом нейтрофилов крови доноров на эффекторные функции (фагоцитарную и лизосомальную) моноцитов был установлен моноцитсупрессорный эффект секреторных продуктов неактивированных нейтрофилов и моноцитстимулирующий эффект продуктов секреции активированных нейтрофилов (табл. 3).

**Библиографическая ссылка:**

Третьякова И.Е., Пуциева А.Л., Гадиева В.А. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №3. Публикация 2-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-3/5121.pdf> (дата обращения: 01.09.2015). DOI: 10.12737/13070

Иммунотропная активность супернатантов неактивированных и активированных нейтрофилов крови доноров (индексы сдвига показателей,  $M \pm m$ )

Показатели функциональной активности моноцитов доноров	Супернатанты неактивированных нейтрофилов ( $n=10$ )	Супернатанты активированных латексом нейтрофилов ( $n=10$ )
Активность фагоцитоза, %	$0,8 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,06$ $P=0,0001$
Интенсивность фагоцитоза, ед.	$0,7 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,05$ $P=0,0001$
Лизосомальная активность, ед.	$0,7 \pm 0,04$	$1,6 \pm 0,05$ $P=0,0001$

Примечание:  $P$  – достоверность различий показателей по отношению к супернатантам неактивированных нейтрофилов крови доноров. Использован критерий Вилкоксона

**Выводы:**

1. Стимуляция нейтрофилов крови доноров частицами латекса приводила к росту уровней секреции продуктов перекисного окисления липидов, антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), протеазы, лизоцима, провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО $\alpha$ .
2. Анализ иммунотропной активности секреторных продуктов нейтрофилов крови доноров показал, что супернатанты активированных латексом нейтрофилов обладают моноцитстимулирующей активностью, супернатанты неактивированных нейтрофилов обладают моноцитсупрессирующей активностью.

**Литература**

1. Гамалей И.А. О регуляторной роли активных форм кислорода в клетке // Цитология. 1999. Т.41. С. 767.
2. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Москва: Издательство РАМН, 2009. 204 с.
3. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Власов А.В. Способ получения иммуностимулирующих нейтрофилокинов. Авторское свидетельство. №1536977. 1987.
4. Коробейникова Э.Н., Зурочка А.В., Евдокимова Е.В., Ильиных Е.И., Кудревич Ю.В. Показатели липидного обмена в сыворотке крови практически здорового населения, проживающего в Южно-Уральском регионе в условиях адаптации к климатическим и техногенным воздействиям. Челябинск, 2002. 50 с.
5. Северин Е.С. Биохимия. 5-е изд., исправлен. и доп. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 759 с.
6. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Никифоров А.А., Бондарь С.С. Продукция цитокинов клетками цельной крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием низкоинтенсивного СВЧ-облучения // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-57. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4815.pdf> (дата обращения: 30.06.2014). DOI: 10.12737/5025
7. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Морфо-функциональные проявления острого респираторного дистресс-синдрома и его коррекция СВЧ-излучением в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-58. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4817.pdf> (дата обращения: 30.06.2014). DOI: 10.12737/5026
8. Третьякова И.Е., Долгушин И.И., Зурочка А.В. Влияние секреторных продуктов активированных нейтрофилов на морфологический состав и функциональную активность клеток перитонеального экссудата в динамике воспаления стафилококковой этиологии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Том 137, №2. С.198–201.
9. Хайтов Р.М. Иммунология. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 521 с.

**References**

1. Gamaley IA. O regul'yatornoy roli aktivnykh form kisloroda v kletke. Tsitologiya. 1999;41:767. Russian.

**Библиографическая ссылка:**

Третьякова И.Е., Пуциева А.Л., Гадиева В.А. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №3. Публикация 2-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-3/5121.pdf> (дата обращения: 01.09.2015). DOI: 10.12737/13070

2. Dolgushin II, Andreeva YuS, Savochkina AYu. Neytrofil'nye lovushki i metody otsenki funktsional'nogo statusa neytrofilov. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2009. Russian.
3. Dolgushin II, Zurochka AV, Vlasov AV. Sposob polucheniya immunostimuliruyushchikh neytrofilokinov. Avtorskoe svidetel'stvo. №1536977; 1987. Russian.
4. Korobeynikova EN, Zurochka AV, Evdokimova EV, Il'nykh EI, Kudrevich YuV. Pokazateli lipidnogo obmena v syvorotke krovi prakticheski zdorovogo naseleniya, prozhivayushchego v Yuzhno-Ural'skom regione v usloviyakh adaptatsii k klimaticheskim i tekhnogennym vozdeystviyam. Chelyabinskzh 2002. Russian.
5. Severin ES. Biokhimiya. 5-e izd., ispravlen.i dop. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. Russian.
6. Terekhov IV, Khadartsev AA, Nikiforov AA, Bondar' SS. Produktsiya tsitokinov kletkami tsel'noy krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoy pnevmonii pod vliyaniem nizkointensivnogo SVCh-oblucheniya. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie [internet]. 2014 [cited 2014 Jun 30];1:[about 6 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4815.pdf>. DOI: 10.12737/5025
7. Terekhov IV, Khadartsev AA, Nikiforov VS, Bondar' SS. Morfo-funktsional'nye proyavleniya ostrogo respiratornogo distress-sindroma i ego korrektsiya SVCh-izlucheniem v eksperimente. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie [internet]. 2014[cited 2014 Jun 30];1:[about 7 p.]. Russian. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/4817.pdf>. DOI: 10.12737/5026
8. Tret'yakova IE, Dolgushin II, Zurochka AV. Vliyanie sekretornykh produktov aktivirovannykh neytrofilov na morfologicheskiy sostav i funktsional'nuyu aktivnost' kletok peritoneal'nogo ekssu-data v dinamike vospaleniya stafilokokkovoy etiologii. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2004;137(2):198-201. Russian.
9. Khaitov RM. Immunologiya. 2-e izd., pererab. i dop. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. Russian.

---

**Библиографическая ссылка:**

Третьякова И.Е., Цуциева А.Л., Гадиева В.А. Секреторные продукты нейтрофилов крови доноров // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №3. Публикация 2-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-3/5121.pdf> (дата обращения: 01.09.2015). DOI: 10.12737/13070