

печени и α_2 -МГ в крови была меньше — на 5 и 7 % ($p < 0,05$), α_2 -МГ в печени и α_1 -АТ в крови, напротив, незначительно выше — на 11 и 6 % ($p < 0,05$).

Стадия истощения общего адаптационного синдрома у крыс, которые получали L-тироксин, характеризуется менее существенным падением активности α_1 -АТ и α_2 -МГ по сравнению с аналогичной группой животных, не получавших препарат: в печени на 25 и 14 % ($p < 0,05$) (то есть на 14 и 9 % меньше), в крови на 18 и 17 % ($p < 0,05$) (на 11 и 18 % меньше). По сравнению с ее величиной в контроле активность α_1 -АТ и α_2 -МГ была несколько ниже: на 21 и 13 % ($p < 0,05$) в печени и на 20 и 22 % ($p < 0,05$) в крови. По отношению к ее значению у стрессированных крыс, которым не вводили L-тироксин, в этот же период исследования активность α_1 -АТ и α_2 -МГ была больше: в печени на 18 и 10 % ($p < 0,05$), в крови на 9 и 13 % ($p < 0,05$).

Выводы

Стадия тревоги стресс-реакции характеризуется разнонаправленным изменением активности протеиназ в печени (повышением активности α_1 -АТ и снижением таковой α_2 -МГ) и ростом активности α_2 -МГ в крови. Стадия резистентности сопровождается нивелированием изменения активности α_2 -МГ в крови и обоих ингибиторов протеолитических ферментов в печени. На стадии истощения общего адаптационного синдрома наблюдается снижение активности ингибиторов протеиназ и в печени, и в крови.

Экспериментальный гипотиреоз, *per se* сопровождающийся уменьшением антипротеолитической активности в печени и крови, вызывает глубокое угнетение активности α_1 -АТ и α_2 -МГ в печени и крови на всех стадиях общего адаптационного синдрома. L-тироксин в малых дозах, сам по себе не влияющий на активность ингибиторов протеолитических ферментов, на стадии тревоги стресс-реакции стимулирует их активность, на стадии устойчивости предупреждает снижение активности α_2 -МГ, на стадии истощения общего адаптационного синдрома ограничивает депрессию ингибиторной активности.

Полученные нами результаты доказывают важное значение йодсодержащих тиреоидных гормонов в регуляции активности основных эндогенных ингибиторов протеолитических ферментов в динамике стресс-реакции, что открывает новый аспект участия йодтиронинов в антистресс-системе, связанный с поддержанием баланса в системе протеиназы/ингибиторы и предупреждением развития лизосомальной дисфункции, лежащей в основе постоянно растущего списка заболеваний человека стрессорной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веремеенко, К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. — Киев: Здоров'я, 1998. — С. 54–119.
2. Barrett, A. J. The handbook of proteolytic enzymes / A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner. — London: Academic press, 2012. — P. 56–121.
3. Turino, G. M. The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis / G. M. Turino // Chest. — 2002. — Vol. 122, № 3. — P. 1058–1060.
4. Городецкая, И. В. Роль белкового синтеза в реализации протекторных кардиальных эффектов тиреоидных гормонов при иммобилизационном стрессе / И. В. Городецкая, А. П. Божко // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, № 3. — С. 349–357.
5. Значение тиреоидных гормонов в стресс-индуцированном синтезе белков теплового шока в миокарде / И. В. Городецкая [и др.] // Бюл. эксперим. биол. мед. — 2000. — Т. 130, № 12. — С. 617–619.

УДК 616.155.34

NET-ОБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ

Гусакова Н. В.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Образование NETs (neutrophil extracellular traps), как одно из проявлений функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ), вызывает интерес у исследователей раз-

личного профиля. При этом в литературе встречается несколько способов выделения НГ для дальнейшего изучения их NET-образующей способности, что, по-видимому, сказывается на разнообразных и часто противоречивых результатах. Традиционно, выделение НГ проводят путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности [1]. Однако, данный способ, несмотря на высокую чистоту выделения (количество НГ >95 %), обладает рядом недостатков. Так, имеются работы, указывающие на более низкий количественный выход НГ от заявленного в протоколе выделения НГ путем градиентного центрифугирования, что может затруднить исследование при работе с малыми объемами образцов [2]. Кроме того, полисахарид фиколл является одним из факторов, дополнительно стимулирующих реактивность НГ, в частности, спонтанную генерацию АФК, активацию МПО [3]. Имеются сообщения о снижении хемотаксической и фагоцитарной активности НГ, выделенных на градиенте плотности, в сравнении с гранулоцитами, полученными из лейкоцитарной взвеси [1, 4]. Также установлена зависимость количества клеток, полученных путем градиентного центрифугирования, от однородности популяции НГ по размеру и плотности, в противном случае, данный метод выделения может оказаться неэффективным [4].

Цель

Проанализировать параметры NET-образующей активности НГ, выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколла-верографина, и полученных из лейкоцитарной суспензии путем отстаивания.

Материал и методы исследования

Для выделения лейкоцитов 5 мл венозной крови забирали в пластиковые пробирки с гепарином (20 Ед/мл), отстаивали при 37 °С в течение 30 мин под углом 45°, затем в вертикальном положении 15 мин при комнатной температуре.

Для выделения чистых клеточных культур НГ использовали двойной градиент плотности фиколла-верографина, при этом плотность верхнего слоя градиента составляла 1,077 г/см³, нижнего — 1,119 г/см³. Объем каждого слоя градиента составлял 1,5 мл. После удаления богатой тромбоцитами плазмы кровь разводили 0,9 % NaCl в соотношении 1:1, наслаивали на ступенчатый градиент плотности фиколла-верографина и центрифугировали в течение 30 мин при 500 g. После центрифугирования на границе между градиентами появлялось кольцо гранулоцитов, которые переносили в центрифужную пробирку, трижды отмывали от градиента фосфатно-солевым буфером (рН = 7,4) и доводили до концентрации 5×10⁶ клеток/мл. Лейковзвесь содержала не менее 95 % нейтрофилов (окраска 0,1 % сафранином), жизнеспособность клеток в тесте исключения трипанового синего была не менее 90 %.

Для получения лейкоцитарной суспензии верхний слой плазмы удаляли, нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку собирали в отдельную пробирку, центрифугировали 5 мин при 250 g, затем трижды отмывали лейкоциты фосфатно-солевым буфером (рН = 7,4) и доводили до концентрации 5×10⁶ клеток/мл. В работе использовалась суспензия лейкоцитов с содержанием 75 ± 10 % гранулоцитов, жизнеспособность клеток в тесте исключения трипанового синего была не менее 90 %.

Интенсивность процессов NET-образующих свойств НГ оценивали после инкубации клеточной взвеси в течение 150 мин при 37 °С в среде RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США) После инкубации клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 250 g, осадок ресуспензировали и делали тонкие мазки. Затем предметные стекла высушивали, фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому — Гимзе. Микроскопировали с использованием иммерсионного увеличения (×1000), подсчет производили в щеточной каемке. NET были представлены тонкими свободнолежащими внеклеточно расположенными нитями, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее размер неизмененного нейтрофила. Подсчитывали процентное содержание NET при просмотре 200 нейтрофилов.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов, результаты выражали в виде Me (25 %; 75 %), где Me — медиана, 25 % — нижний квартиль, 75 % — верхний квартиль. Различия считали значимыми при p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами был проведен сравнительный анализ NET-образующей активности НГ здоровых лиц ($n = 7$), выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколла-верографина, и полученных из лейкоцитарной суспензии. Результаты представлены на рисунке 1.

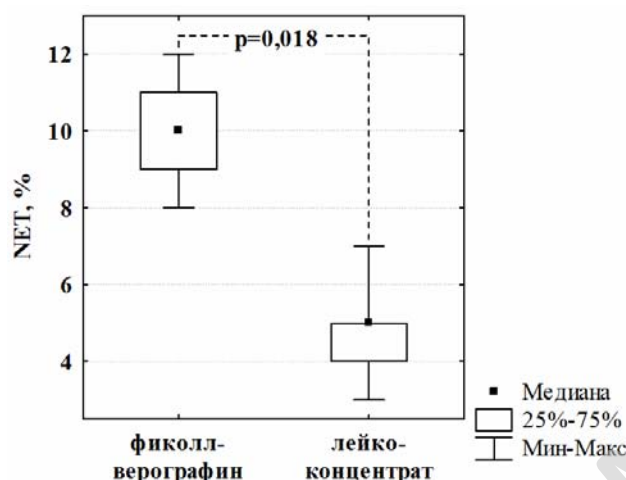


Рисунок 1 — Значимость различий оценивалась по W-критерию Вилкоксона. Показатели нетоза в зависимости от способа выделения нейтрофилов

Как видно из рисунка 1, уровень NET-образования НГ, выделенных в градиенте плотности фиколла-верографина (10 (9; 11) %), значительно выше ($p = 0,018$) по сравнению с аналогичными показателями, полученными при использовании лейкоцитарной суспензии (5 (4; 5) %).

Более высокий количественный выход NET при градиентном разделении лейкоцитов с использованием фиколла-верографина, возможно, связан как с механическим воздействием на НГ при выделении (длительное центрифугирование, многократное отмывание и ресуспендирование), так и с неспецифической преактивацией NET-образующей активности самим фиколлом, на что указывают некоторые авторы [3, 5]. В то же время, использование лейкоконцентрата, полученного путем отстаивания гепаринизированной периферической крови, является наиболее физиологичным, позволяя свести к минимуму травмирование и изменение функциональных свойств клеток путем сокращения времени выделения НГ и отсутствия активирующего влияния фиколла, существенно снижает, таким образом, трудоемкость исследования и не требует расхода дорогостоящих реактивов. Дополнительным преимуществом данного метода является возможность оценки функциональной активности НГ с учетом межклеточной регуляции, поскольку используется смешанная суспензия лейкоцитов, содержащая как гранулоциты, так и агранулоциты, образующие единую взаимосвязанную систему.

Выводы

1. Выявлена более высокая интенсивность NET-образующей активности НГ, выделенных путем градиентного центрифугирования в сравнении с гранулоцитами, полученными из лейкоцитарной суспензии путем отстаивания.
2. Для изучения образования NET *in vitro* рекомендуется использование лейкоцитарной суспензии, полученной путем отстаивания и стандартизированной по количеству нейтрофилов (5×10^6 клеток/мл).

ЛИТЕРАТУРА

1. Quinn, M. T. Neutrophil methods and protocols / M. T. Quinn, R. D. Frank // Humana Press Inc., 2007.—537 p.
2. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies / L. Zhou [et al.] // Clin Vaccine Immunol. — 2012. — Vol. 19, № 7. — P. 1065–1074.
3. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient / I. M. Rebecchi [et al.] // Cell Biochemistry and Function. — 2000. — № 18. — P. 127–132.
4. Mosca, T. Comparative efficiency and impact on the activity of blood neutrophils isolated by percoll, ficoll and spontaneous sedimentation methods / T. Mosca, W. C. Forte // Journal of Molecular and Cellular Immunology. — 2016. — Vol. 45. — P. 29–37.
5. Harris, P. Effect of density gradient material upon ex-vivo neutrophil behaviour / P. Harris // Mres Thesis Project [Electronic resource]. — 2012. — Mode of access: https://www.etheses.bham.ac.uk/3901/1/Harris_MRes_12.pdf. — Date of access: 03.06.2016.