

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»



АДРЕС РЕДАКЦИИ:

115088, Москва,
ул. Скотопрогонная, д.29/1,
подъезд 15

E-mail: meditsina@mtu-net.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР № 010215 от 29.04.97

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале "Иммунология", помещаются в Excerpta Medica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; INIS Atomindex (International Nuclear Information System); Ulrich's International Periodicals Directory.

"MEDITSINA"
Publishing House

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ
Тел. 8 (495) 678-64-84

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели

Редактор *Е. К. Константинова*

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Технический редактор *Т. В. Нечаева*
Корректор *Л. В. Кузнецова*
Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 26.03.2014.
Подписано в печать 16.04.2014.
Формат 60 × 88 1/8.
Печать офсетная.
Печ. л. 6,00.
Усл. печ. л. 5,88.
Уч.-изд. л. 8,3.
Заказ 218.

Отпечатано в ООО "Подольская Периодика", 142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Индекс 71492 – для индивидуальных подписчиков
Индекс 71493 – для предприятий и организаций

ISSN 0206-4952. Иммунология. 2014.
Т. 35. № 3. 121—168.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА



И.И. Мечников

ИММУНОЛОГИЯ

Двухмесячный научно-практический журнал

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1980 г.

Журнал входит в перечень периодических научно-технических изданий, рекомендуемых ВАК Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук

Том 35

3

2014

МАЙ – ИЮНЬ

Главный редактор академик РАН и РАМН Р. М. ХАИТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Л. П. АЛЕКСЕЕВ, член-корр. РАМН, профессор, доктор мед. наук, Р. И. АТАУЛ-ЛАХАНОВ, профессор, доктор мед. наук, Ф.Ю. ГАРИБ, профессор, доктор мед. наук (научный редактор), Г. О. ГУДИМА, профессор, доктор биол. наук, И. С. ГУЩИН, член-корр. РАМН, профессор, доктор мед. наук, Н. И. ИЛЬИНА, профессор, доктор мед. наук, З. Г. КАДАГИДЗЕ, профессор, доктор мед. наук, Э. В. КАРАМОВ, профессор, доктор биол. наук, А. В. КАРАУЛОВ, член-корр. РАМН, доктор мед. наук, профессор, Н. В. МЕДУНИЦЫН, академик РАМН, доктор мед. наук, Р. В. ПЕТРОВ, академик РАН, Б. В. ПИНЕГИН (зам. главного редактора), профессор, доктор мед. наук, Ю. П. РЕЗНИКОВ, профессор, доктор мед. наук, И. Г. СИДОРОВИЧ, профессор, доктор мед. наук, А. С. СИМБИРЦЕВ, профессор, доктор мед. наук, А. В. ФИЛАТОВ, профессор, доктор биол. наук, И. С. ФРЕЙДЛИН, член-корр. РАМН, доктор мед. наук, М. Р. ХАИТОВ, доктор мед. наук

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Г. И. АБЕЛЕВ (Москва), Т. У. АРИПОВА (Ташкент), С. С. ГАМБАРОВ (Ереван), А. В. ЕМЕЛЬЯНОВ (Санкт-Петербург), В. А. КОЗЛОВ (Новосибирск), Л. В. ЛУСС (Москва), А. Н. МАЯНСКИЙ (Нижний Новгород), М. П. ПОТАПНЕВ (Минск), М. З. САИДОВ (Махачкала), Р. И. СЕПИАШВИЛИ (Москва), Л. А. СИЗЯКИНА (Ростов-на-Дону), Н. Ю. СОТНИКОВА (Иваново), И. А. ТУЗАНКИНА (Екатеринбург), В. А. ЧЕРЕШНЕВ (Екатеринбург)

Зав. редакцией журнала *Галина Ивановна ГАВРИКОВА*
e-mail: gigavr@yandex.ru

**IZDATEL'STVO
MEDITSINA**



MOSCOW

115088, Moscow,
Novoostapovskaya str., 5,
building 14

Tel.: +7(495) 670-65-94

E-mail: gigavr@yandex.ru

www.medlit.ru

ЛП № 010215 от 29.04.97

**Subscription index
for individuals
71492**

**Subscription index
for individuals
71492**

ISSN 0206-4952

**RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
INSTITUTE OF IMMUNOLOGY OF FEDERAL MEDICAL AND BIOLOGICAL AGENCY**



И.И. Мечников

IMMUNOLOGIYA

Bimonthly scientific-practical Journal

SINCE 1980

Том 35

3

2014

MAY – JUNE

**Editor-in-Chief Rakhim KHAITOV,
MD, PhD, DSc, Prof., academician of RAS and RAMS**

THE EDITORIAL BOARD:

LEONID ALEXEEV, corresponding member of RAMS, MD, PhD, Dsc., prof., RAVSHAN ATAULLAKHANOV, MD, PhD, Dsc., prof., FIRUZ GARIB, MD, PhD, Dsc., prof., GEORGIY GUDIMA, DBS, PhD, Dsc., prof., IGOR GUSHCHIN, corresponding member of RAMS, MD, PhD, Dsc., prof., NATALIA ILYNA, MD, PhD, Dsc., prof., ZAIRA KADAGIDZE, MD, PhD, Dsc., prof., EDWARD KARAMOV, DBS, PhD, Dsc., ALEXANDER KARAULOV, corresponding member of RAMS, MD, PhD, Dsc., prof., NICKOLAY MEDUNITSYN, Academician of RAMS, MD, PhD, Dsc., REM PETROV, Academician of RAN and RAMS, BORIS PINEGIN (Deputy Editor), MD, PhD, Dsc., prof., YURI RESNIKOV, MD, PhD, Dsc., prof., IGOR SIDOROVICH, MD, PhD, Dsc., prof., ANDREY SIMBIRTSEV, MD, PhD, Dsc., prof., ALEXANDER FILATOV, DBS, PhD, Dsc., prof., IRINA FREYDLINA, corresponding member of RAMS, MD, PhD, Dsc., prof., MUSA KHAITOV, MD, PhD, Dsc.

THE EDITORIAL STAFF:

GARRY ABELEV (Moscow), TAMARA ARIPOVA (Tashkent), SPARTAK GAMBAROV (Erevan), ALEXANDER EMEL'YANOV (St. Petersburg), VLADIMIR KOZLOV (Novosibirsk), LUDMILA LUSS (Moscow), ANDREW MAYANSKY (Nizhny Novgorod), ALEXANDER MIKHAYLENKO (Tver), MICHAIL POTAPNEV (Minsk), MARAT SAIDOV (Makhachkala), REVAZ SEPIASHVILI (Moscow), LUDMILA SIZYAKINA (Rostov-on-Don), NATALIA SOTNIKOVA (Ivanovo), IRINA TUZANKINA (Ekaterinburg), VALERY CHERESHNEV (Ekaterinburg)

Izdatel'stvo Meditsina Publishers

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

- Воробьева Н.В., Голубева Н.М., Пинегин Б.В.** Роль актинового цитоскелета в регуляции дегрануляции нейтрофилов человека, активированных опсонизированным зимозаном 124
- Маянская И.В., Васильева Е.А., Ашкинази В.И., Кропотов В.С., Толкачева Н.И., Руднева Е.И., Федулова Э.Н., Широкова Н.Ю., Тутина О.А.** Влияние секреторных факторов фибробластов на кислородзависимый метаболизм нейтрофилов 130
- Юрчинский В.Я., Ерофеева Л.М.** Роль лимфоидного компонента в формировании ключевых макро-микроморфологических характеристик тимуса позвоночных животных и человека 134

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНИТЕТА

- Шукшина О.Г., Масная Н.В., Исаякина Н.В., Шерстобоев Е.Ю., Калинин Г.И.** Влияние растительных полифенольных комплексов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток in vitro. 138

ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

- Ахматова Н.К., Грубер И.М., Ахматов Э.А., Черкасова Л.С., Игнатова О.М., Михайлова Н.А.** Стафилококковая вакцина: влияние на киллерную активность лейкоцитов и неспецифическую резистентность 143
- Фирстова В.В., Павлов В.М., Горбатов А.А., Комбарова Т.И., Караулов А.В., Дятлов И.А.** Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами f.tularensis 15 нииэг, на формирование антиуларемийного клеточного и гуморального иммунного ответа 147

ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ

- Хонина Н.А., Селедцова Н.В., Тихонова М.А., Овсянникова Т.В., Черных Е.Р.** Содержание регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Т-клеток в циркуляции и эндометрии у фертильных и бесплодных женщин в разные фазы менструального цикла. 151

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

- Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Камышников О.Ю., Андреев С.М., Шиловский И.П., Хаитов М.Р.** Аллергенспецифическая иммунотерапия при экспериментальном atopическом дерматите 155
- Руденко К.А., Тугуз А.Р., Анохина Е.Н., Муженя Д.В.** Полиморфизмы генов toll-подобных рецепторов, ассоциированных с наследственной отягощенностью и возрастом манифестации бронхиальной астмы 160

ИММУНОПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

- Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Орловская И.А., Гилева И.П., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Цырендоржиева М.Д., Александров Т.И., Щелкунов С.Н., Козлов В.А.** Влияние TNF-связывающего белка CrmB вируса натуральной оспы на TNF-стимулированные функции мононуклеарных клеток крови и синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом ... 163

CELL IMMUNOLOGY

- Vorob'yova N.V., Golubeva N.M., Pinegin B.V.** Essential role of actin cytoskeleton in regulation of granule exocytosis in human neutrophils activated with opsonized zymosan 124
- Mayanskaya I.V., Vasilyeva E.A., Achkinazi V.I., Kropotov V.S., Tolkacheva N.I., Rudneva E.I., Fedulova E.N., Chirokova N.U., Tutina O.A.** Influence of fibroblast secretory products on oxygen-dependent neutrophile metabolism 130
- Yurchinskiy V.Ya., Erofeeva L.M.** Role of lymphoid component in forming the main macro-micromorphological parameters of thymus of vertebral animals and human 134

REGULATION OF IMMUNITY

- Shukshina O.G., Masnaya N.V., Isaykina N.V., Sherstoboev E.Yu., Kalinkina G.I.** Influence of plant vegetative polyphenolic complexes on the functional activity of immunocompetent cells in vitro 138

INFECTIOUS IMMUNOLOGY

- Akhmatova N.K., Gruber I.M., Akhmatov E.A., Cherkasova L.S., Ignatova O.M., Mikhaylova N.A.** Staphylococcal vaccine: the impact on biocidal activity of leukocytes and nonspecific resistance 143
- Firstova V.V., Pavlov V.M., Gorbato A.A., Kombarova N.I., Karaulov A. V., Dyatlov I.A.** Influence of inflammation appearance in BALB/c mice, induced by vaccination with various doses of f.tularensis 15 NIIEG, on the development of cellular and humoral antituberculosis immune response 147

IMMUNOLOGY OF REPRODUCTION

- Khonina N.A., Seledtsova N.V., Tikhonova M.A., Ovsyannikova T.V., Chernykh E.R.** CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T cells in fertile women and women with unexplained infertility in different phases of menstrual cycle 151

EXPERIMENTAL AND CLINICAL ALLERGOLOGY

- Sherashakova N.N., Babakhin A.A., Bashkatova E.N., Kamishnikov O. Yu., Andreev S.M., Shilovskiy I.P., Khaitov M.R.** Allergen-specific immunotherapy of experimental atopie dermatitis 155
- Rudenko K.A., Tuguz A.R., Anokhina E.N., Muzhenya D.V.** Gene polymorphisms of Toll-like receptors associated with hereditary abnormalities and age of asthma onset 160

IMMUNOPATHOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

- Tsyrendorzhiyev D.D., Sennikov S.V., Orlovskaya I.A., Gileva I.P., Kurilin V.V., Lopatnikova Yu.A., Tsyrendorzhiyeva M.D., Alexandrov T.I., Schelkunov S.N., Kozlov V.A.** Influence of tnfr-binding protein CrmB of variola virus on the tnfr-stimulated functions of blood mononuclear cells and sinovial fluid from patients with rheumatoid arthritis 163

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 612.112.91.083

Воробьева Н.В.¹, Голубева Н.М.², Пинегин Б.В.²

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕГУЛЯЦИИ ДЕГРАНУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА, АКТИВИРОВАННЫХ ОПСОНИЗИРОВАННЫМ ЗИМОЗАНОМ

¹Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1/12; ²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Изучено действие вещества, вызывающего диссоциацию филаментного актина, цитохалазина В (ЦБ), на дегрануляцию нейтрофилов человека, индуцированную опсонизированным зимозаном. Впервые показано, что низкие дозы ЦБ усиливают экзоцитоз азурофильных и специфических гранул относительно стимуляции одним опсонизированным зимозаном на 26 и 33% соответственно. Высокие дозы ЦБ дозозависимо ингибируют дегрануляцию клеток. Предложена модель, описывающая экзоцитоз гранул у нейтрофилов человека в зависимости от динамического состояния филаментного актина.

Ключевые слова: нейтрофил; экзоцитоз гранул; актиновый цитоскелет; компартиментализация мембраны; опсонизированный зимозан

Vorob'yova N.V., Golubeva N.M., Pinegin B.V.

ESSENTIAL ROLE OF ACTIN CYTOSKELETON IN REGULATION OF GRANULE EXOCYTOSIS IN HUMAN NEUTROPHILS ACTIVATED WITH OPSONIZED ZYMOSAN

Here, a comprehensive analysis of actin dissociating drug cytochalasin B (CB) on exocytosis of human neutrophils induced with opsonized zymosan have been performed. For the first time we showed that low doses of CB stimulated an exocytosis of azurophilic and specific granules, while high doses of CB decreased it in a dose-dependent manner. We conclude that in accordance with a model «fence» and «pickets» low doses of CB facilitated the clusterization of FcγR, while high doses of CB inhibited actin reorganization and prevented particle internalization and granule exocytosis. Based on our data, a model of degranulation in dependence on functional state of cortical actin is proposed.

Key words: neutrophil; granule exocytosis; actin cytoskeleton; membrane compartmentalization; opsonized zymosan

Нейтрофилы человека играют существенную роль в защите хозяина от патогенов, бактерий, грибов и вирусов [1]. Как только патоген инфицирует хозяина, нейтрофилы немедленно мигрируют в участки инфекции, привлекаемые хемоаттрактантами [2]. Здесь они распознают патогенассоциированные молекулярные паттерны при участии таких трансмембранных паттернраспознающих рецепторов, как ТМ-like-рецепторы. Далее нейтрофилы быстро фагоцитируют патогены, опсонизированные антителами или комплекментом. Процесс фагоцитоза сопровождается активацией нейтрофила, приводящей к синтезу активных форм кислорода (АФК), высвобождению протеолитических ферментов и антимикробных пептидов в результате экзоцитоза гранул [3].

Долгое время существовало каноническое представление, согласно которому поглощение мишеней фагоцитами происходит при взаимодействии рецепторов с лигандами, что напоминает «застежки молнии». Такая модель была основана на предположении, согласно которому мономерные IgG-рецепторы равномерно распределены по клеточной поверхности фагоцита и свободно диффундируют в соответствии с броуновским движением, пока не столкнутся с подходящим лигандом [4]. Эта концепция соответствовала жидкомозаичной модели организации цитоплазматической мембраны, предложенной S. Singer и G. Nicolson [5].

Однако эта модель не могла объяснить некоторые процессы, происходящие в мембране; например, подвижность белков в цитоплазматической мембране была гораздо ниже, чем в искусственных бислоях со сходным липидным составом. В связи с этим А. Kusumi и соавт. [6, 7] выдвинули новую концепцию организации мембраны. Используя высокоскоростной метод отслеживания индивидуальных частиц SPT (high-speed single-particle tracking), авторы показали, что мембрана представляет собой не гомогенный жидкий слой, а состоит из компартментов (corrals). Внутри этих компартментов диффузия белков и липидов происходит свободно, однако возможно и их перескакивание в соседние компартменты. Экспериментально показано, что такая компартиментализация обусловлена актиновым цитоскелетом, выстилающим цитозольную поверхность плазматической мембраны. По данным А. Kusumi и соавт. [6–8], именно кортикальный актин образует решетчатую структуру, ограничивающую латеральное передвижение мембранных белков (модель fence). Кроме того, белковые молекулы, пронизывающие кортикальный цитоскелет и мембрану одновременно, действуют как «колья», ограничивающие диффузию липидов и других белков между компартментами (модель pickets).

В связи с отказом от традиционной жидкомозаичной структуры мембраны в пользу компартиментализованной (модель fence и pickets) появилась необходимость пересмотреть подвижность мембранных рецепторов, в частности FcγR, при фагоцитозе. Так, V. Jaumouille и S. Grinstein, используя метод SPT на модели FcγRIIA первичных макрофагов человека, показали, что рецепторы к иммуноглобулинам в покоящихся клетках существуют главным образом в виде мономеров.

Для корреспонденции: Воробьева Нина Викторовна, e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

For correspondence: Vorob'yova Nina Viktorovna, e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Однако при активации макрофагов появляются две различные субпопуляции FcγRIIA, отличающиеся по подвижности в плоскости мембраны. Одна из них представлена свободно диффундирующими мономерами, другая – рецепторами, ограниченными компартментами, которые образованы кортикальным актином [9].

Основываясь на новых представлениях об организации мембраны и данных V. Jaumouillé и S. Grinstein [9], касающихся подвижности Fcγ-рецепторов при фагоцитозе, мы предположили, что связывание рецепторов с лигандами будет усиливаться при мягком разрушении актинового цитоскелета благодаря повышению латеральной подвижности мономерных рецепторов. В соответствии с нашим предположением добавление низких доз препаратов, вызывающих диссоциацию филаментного актина, например цитохалазина В (ЦБ), должно активировать фагоцитоз и сопровождающий его экзоцитоз гранул. Однако более высокие концентрации ЦБ должны подавлять ремоделирование актина в фагоцитарной чаше, необходимое для интернализации мишени, и блокировать фагоцитоз и соответственно экзоцитоз нейтрофильных гранул. Это предположение было проверено на модели дегрануляции нейтрофилов человека, активированных зимозаном, который опсонизирован пуловой сывороткой, и обработанных различными дозами ЦБ.

Материалы и методы. Трипептид N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (ФМЛФ), ЦБ, зимозан, люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) были предоставлены Sigma-Aldrich Corp (США). Среда 199 и RPMI-1640, HEPES, Ficoll/Нураке, фосфатно-солевой буфер (PBS), параформальдегид были получены от “ПанЭко” (Россия). Все моноклональные антитела были предоставлены Beckman Coulter (США), а 96-луночные планшеты – компанией Nunc (Дания).

Зимозан, полученный из *S. cerevisia*, обработали сывороткой от 20 доноров (OZ). Суспензию зимозана в PBS (5 мг·мл⁻¹) кипятили на водяной бане в течение 20 мин. Затем суспензию центрифугировали, супернатант отбрасывали, а осадок инкубировали с сывороткой (5 мг зимозана и 1 мл сыворотки) при 37°C в течение 30 мин. Зимозан отмывали в PBS и ресуспендировали до конечной концентрации 20 мг·мл⁻¹. Аликвоты хранили при -70°C.

Выделение нейтрофилов. Периферическую кровь здоровых доноров забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки, предварительно добавив в них гепарин (20 МЕ/мл крови). Нейтрофилы выделяли по методу А. Вёуш [10] с модификациями. Для этого цельную кровь развели средой 199 в 2 раза и наслаивали на одноступенчатый градиент Ficoll/Нураке плотностью 1,077 г/мл. Центрифугирование проводили при 400 g течение 25 мин. Осадок, обогащенный нейтрофилами, ресуспендировали в среде 199 и добавляли декстран до конечной концентрации 1,3% для седиментации эритроцитов, которая продолжалась 30 мин при комнатной температуре (КТ). После этого отбирали верхний слой жидкости, гранулоциты осаждали центрифугированием при 1200 об/мин 10 мин. Полученный осадок клеток промывали в PBS, а примесные эритроциты лизировали в гипотоническом растворе (0,2% NaCl/1 mM ЭДТА) 30 с при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием, промывали в PBS и ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI-1640, 10 mM HEPES, 2 mM α-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина с добавлением 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Полученные клетки были представлены более чем на 97% нейтрофилами, их жизнеспособность составляла более 98%, что определяли по исключению трипанового синего. Концентрацию нейтрофилов доводили до 5·10⁶ мл⁻¹ в ПКС и оставляли при температуре тающего льда на 1 ч.

Экзоцитоз гранул. Экзоцитоз азурофильных и специфических гранул определяли по экспрессии на цитоплазматической мембране CD63 и CD66b соответственно, используя метод проточной цитофлюориметрии, как описано ранее [11]. Покоящиеся нейтрофилы инкубировали в присутствии ЦБ в

различной концентрации в течение 5 мин при 37°C. Далее клетки стимулировали зимозаном, опсонизированным пуловой сывороткой, который добавляли в концентрации 400 мкг/мл. Инкубация продолжалась 20 мин при 37°C, после чего клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида 15 мин при КТ, промывали 1 раз в PBS и осаждали в планшете. Для определения экспрессии маркеров азурофильных и специфических гранул нейтрофилы инкубировали 30 мин с PE-конъюгированными моноклональными антителами к CD63 и FITC-конъюгированными моноклональными антителами к CD66b. По окончании инкубации клетки промывали PBS, переносили в цитометрические пробирки и доводили объем буфера до 400 мкл. Анализ проводили на проточной цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием FL1-детектора (488 нм аргонный лазер, возбуждение флуоресценции при 520 нм) и FL2-детектора (возбуждение флуоресценции при 570 нм).

Хемиллюминесценция. Образование АФК (“дыхательный взрыв”) нейтрофилами человека оценивали с помощью люминолзависимой хемиллюминесценции (ХЛ) с помощью люмометра фирмы LKB (Швеция), как описано ранее [11].

Для оценки выхода АФК использовали лейкоцитарную суспензию, которую получали, смешивая 2 мл гепаринизированной крови с 1 мл 3% желатины на PBS. После спонтанной седиментации эритроцитов при 37°C в течение 15 мин отбирали верхний слой жидкости. Лейкоциты осаждали при 200 g в течение 10 мин и доводили концентрацию клеток до 2·10⁶ мл⁻¹ по сегментоядерным лейкоцитам.

На планшете смешивали 2·10⁵ клеток в объеме 100 мкл, 100 мкл люминола (конечная концентрация 10 мкМ), 300 мкл PBS. Где указано, добавляли OZ или ФМЛФ (конечная концентрация 200 нМ), а также различные дозы ЦБ. Объем жидкости в ячейках составил 500 мкл. ХЛ определяли в течение 40 мин и оценивали следующие параметры (в относительных люминесцентных единицах): пики спонтанной и стимулированной ХЛ, пики ХЛ при добавлении различных доз ЦБ. Степень подавления (стимуляции) ХЛ выражали в % относительно контроля (ХЛ нейтрофилов в отсутствие ЦБ и стимуляторов).

Результаты. Влияние ингибиторов филаментного актина на OZ-стимулированный выход АФК. Известно, что OZ индуцирует образование АФК нейтрофилами человека. Для определения дозы OZ, вызывающей максимальный выход АФК, нейтрофилы инкубировали с опсонизированным зимозаном в диапазоне концентраций 10–400 мкг/мл и измеряли люминолзависимую ХЛ. Полученные результаты показали, что OZ (10–400 мкг/мл) индуцировал четкое повышение образования АФК нейтрофилами. Эффект был дозозависимым с максимальным ответом, полученным в присутствии 400 мкг/мл OZ. Концентрация OZ 1 мкг/мл не индуцировала большого выхода АФК (данные не показаны).

Далее в присутствии 400 мкг/мл OZ к нейтрофилам добавляли ЦБ в концентрации 10⁻⁶–2·10⁻⁵ М и оценивали образование АФК с помощью люминолзависимой ХЛ. Полученные результаты показали, что ЦБ в дозе 10⁻⁶ М увеличивал ХЛ, полученную в присутствии одного лишь OZ, а в дозах ЦБ выше 10⁻⁶ и до 2·10⁻⁵ М ХЛ дозозависимо снижалась (рис. 1).

В следующей серии экспериментов определяли действие различных доз ЦБ при стимуляции нейтрофилов ФМЛФ. Концентрацию ФМЛФ, вызывающую максимальный выход АФК, подбирали в предварительной серии экспериментов, она составила 200 нМ. Дальнейшее повышение дозы ФМЛФ не влияло на образование АФК нейтрофилами (не показано). Добавление ЦБ в концентрации 10⁻⁶–10⁻⁵ М в присутствии 200 нМ ФМЛФ дозозависимо усиливало «дыхательный взрыв», а доза ЦБ, равная 2·10⁻⁵ М, снижала выход АФК (см. рис. 1).

Разрушение кортикального цитоскелета регулирует экзоцитоз азурофильных и специфических гранул при стимуляции OZ. Показано, что фагоцитоз, индуцированный такими нерастворимыми стимулами, как OZ, происходит с участием рецепторов и сопровождается интернализацией частиц и