

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

doi : 10.52485/19986173_2021_1_1

УДК 616-092

Паршина А.А., Цыбиков Н.Н., Караваева Т.М.

ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИЛ-8
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛИТИЧЕСКОГО НЕТОЗА*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000, г. Чита, ул. Горького, 39а***Цель исследования.** Исследование ассоциации литического нетоза с изменением плазменного уровня ИЛ-8 в эксперименте.**Материалы и методы.** Использовали экспериментальные *in vitro* модели покоящихся и предварительно активированных к литическому нетозу нейтрофилов, взвешенных в 1 мл аутоплазмы. Все образцы инкубировали четыре часа при 37°C, далее центрифугировали для осаждения клеток, плазму отбирали для измерения содержания ИЛ-8 методом проточной цитометрии.**Результаты.** В плазме, инкубированной с индуцированными к нетозу клетками, концентрация ИЛ-8 в три раза выше, чем в образцах с покоящимися нейтрофилами.**Заключение.** Гибель нейтрофильных гранулоцитов путем литического нетоза ассоциирована с полным высвобождением внутриклеточных запасов ИЛ-8, что сопровождается резким увеличением его концентрации в зоне формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек и может способствовать хемотаксису циркулирующих нейтрофильных гранулоцитов и последующей их активации в данном участке с развитием дополнительного протеолитического и свободнорадикального повреждения тканей.**Ключевые слова:** нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, ИЛ-8, воспаление, нейтрофилы

Parshina A.A., Tsybikov N.N., Karavaeva T.M.

VARIATIONS OF IL-8 LEVEL IN EXPERIMENTAL MODEL OF LYTIC NETOSIS

*Chita State Medical Academy, 39a, Gorky's street, Chita, Russia, 672000***The aim of the research.** To verify whether netosis is associated with variation of IL-8 plasma level *in vitro*.**Materials and methods.** We used experimental *in vitro* models of isolated from whole blood non-stimulated and PMA-activated (100 nm) neutrophils suspended in 1 ml of platelets poor plasma. All samples were incubated for four hours and then were centrifuged at 1500 r.p.m. for 10 min. 50 µl of plasma from each sample were transferred into separate tubes to quantify IL-8 using flow cytometry method.**Results.** A threefold increase in concentration of IL-8 was revealed in plasma containing PMA-stimulated cells when comparing with non-stimulated samples.**Conclusion.** Lytic netosis is followed by release of intracellular store of IL-8, its extracellular level substantial increase and, thus, contributes to circulating neutrophils recruitment and activation in the sites of NETs formation, that promotes additional proteolytic and free radical damage.**Key words:** neutrophil extracellular traps, netosis, IL-8, neutrophils, inflammation.

Формирование внеклеточных ловушек (НВЛ) является одним из защитных механизмов нейтрофильных гранулоцитов (НГ) наряду с фагоцитарной активностью, а также продукцией протеаз, микробицидных белков и активных форм кислорода (АФК), что позволяет данному виду лейкоцитов принимать участие в реализации воспалительного ответа независимо от его этиологии. Однако, в отличие от классических протективных стратегий, литический нетоз ассоциирован с фундаментальной реорганизацией клеточной структуры и следующим за ней полным разрушением цитолеммы, ведущей к выходу во внеклеточное пространство не только ДНК-сети, но и всего комплекса цитоплазматических компонентов, в том числе предсинтезированных цитокинов, которые обеспечивают формирование как местного, так и системного воспалительного ответа [1, 2, 3, 4], организуя таким образом, кооперацию работы клеточных и гуморальных участников иммунных реакций.

Различный цитокиновый профиль способствует праймированию соответствующих чувствительных элементов, а также отражает их гуморальную активность в условиях воздействия конкретного патогенного фактора (бактерии, вирусы, паразиты, аллергены, атипичные клетки, DAMPs и т.п.). НГ, являясь продуцентами широкого спектра провоспалительных цитокинов и факторов роста, одновременно чувствительны к ним. Известно, что ИЛ-8 (CXCL-8) является наиболее сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, способствуя накоплению и активации, в том числе по аутокринному механизму, преимущественно полиморфноядерных лейкоцитов. Таким образом, в местах формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек можно ожидать локальное изменение уровня ИЛ-8, как наиболее типичного для нейтрофилов хемокина и провоспалительного цитокина. Указанное явление может вести к формированию зоны повреждения и/или расширению участка вторичной альтерации, что определяет его роль в механизмах инициации острого и поддержания хронического воспаления.

В связи с вышесказанным, **целью** данной работы явилось выявление взаимосвязи гибели нейтрофилов путем литического нетоза с локальным изменением уровня ИЛ-8.

Материалы и методы. Для проверки гипотезы была использована экспериментальная *in vitro* модель литического нетоза в бедной тромбоцитами плазме крови (БТП), разработанная и описанная нами ранее [5]. В исследовании приняли участие 30 добровольцев среднего возраста (15 мужчин, 15 женщин). Критериями исключения явились: врожденная патология гемостаза, прием антикоагулянтов и/или антиагрегантов, острые воспалительные процессы любой этиологии, онкопатология (в том числе в анамнезе), сахарный диабет, перенесенные в последние 6 месяцев операции, травмы, обострения ИБС. Перед включением в исследование каждому добровольцу дополнительно выполняли термометрию и общий анализ крови и исключали кандидата при: температуре тела $\geq 37^\circ\text{C}$, уровне гемоглобина ≤ 120 г/л, эритроцитов $< 4,0 \times 10^{12}/\text{л}$, лейкоцитов $\geq 8,5 \times 10^9/\text{л}$. Использовали цельную венозную кровь, забранную в пробирки с 3,2% раствором цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Экспериментальный образец представлял собой 1 мл БТП, содержащей $4,5\text{--}6 \times 10^6/\text{мл}$ нейтрофилов, предварительно активированных к нетозу с использованием 5 мкл (100 нмоль) индуктора – 12-форбол-13-миристат ацетата (ФМА). В качестве контроля использовали 1 мл БТП того же донора, содержащей аналогичное количество не стимулированных НГ. Оба образца инкубировали в течение четырех часов при 37°C , после этого центрифугировали на скорости 1500 оборотов/минуту в течение 10 минут, 50 мкл плазмы отбирали для дальнейшего исследования. Измерение уровня ИЛ-8 выполняли методом проточной цитометрии на аппарате CytoFlex (Beckman Coulter, США) с использованием панели для мультиплексного анализа Human Thrombosis Panel (Bio Legend, США).

Статистическая обработка проведена с использованием программного обеспечения Statistica 10 (Stat Soft Inc., США). Все данные представлены как медиана и 25 и 75 перцентили – Me [Q0,25; Q0,75]. Для сравнения результатов использован тест Уилкоксона для зависимых совокупностей. Значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выявлено трехкратное увеличение уровня ИЛ-8 в плазме крови, инкубированной с активированными клетками в сравнении с покоящимися (Таблица 1).

Таблица 1

Концентрация ИЛ-8 в исследованных образцах плазмы

Показатель	Образец	Значение показателя	P
ИЛ-8 пг/мл	Покоящиеся нейтрофилы	2422 [880,8; 4852,5]	0,007
	Активированные нейтрофилы	7836,25 [5422,5; 10786,5]	

$p < 0,05$ – значимые отличия

Полученные результаты свидетельствуют о возможности локального, ассоциированного с образованием НВЛ, повышения концентрации провоспалительного

цитокина и хемокина ИЛ-8, что позволяет экстраполировать данные в *in vivo* и предположить участие подобного механизма в инициации, развитии и поддержании воспалительного ответа различной локализации и этиологии. Так, гибель НГ путем литического нетоза и связанное с ним местное нарастание содержания ИЛ-8 может способствовать хемотаксису нейтрофилов из циркуляции и их активации, сопровождающейся не только образованием НВЛ, но и массивному высвобождению ферментов и АФК, что обеспечивает формирование обширной зоны повреждения.

При персистирующем течении воспаления можно ожидать постепенного роста плазменного уровня ИЛ-8 и активации гранулоцитопоеза [6, 7, 8]. Принимая во внимание полученные данные, в контексте данного исследования, есть основания рассматривать механизм порочного круга, где иницирующий фактор активирует НГ и индуцирует нетоз, в результате чего увеличивается концентрация ИЛ-8, ведущая к накоплению и активации новых НГ, и ситуация повторяется [9].

Ряд работ служит подтверждением данного предположения. Так, в работе S.T. Abrams с соавторами (2020 год) продемонстрирована прямая связь между уровнем формирования НВЛ, концентрацией ИЛ-8, а также эффективностью применения антител против ИЛ-8 и/или, участвующих во внутриклеточном проведении сигнала от рецептора ИЛ-8, в отношении профилактики развития ДВС-синдрома при септических состояниях [3, 4, 7]. Важность наличия провоспалительного цитокинового фона как фактора, способствующего усиленному формированию ДНК-ловушек, показана и в экспериментальной работе J.J.R. Richardson и соавторов (2017 год) в группе пациентов с колоректальным раком, где проведено сравнение различных естественных и искусственных индукторов нетоза и выявлена большая степень продукции НВЛ клетками пациентов при использовании провоспалительных цитокинов и ЛПС бактерий в сравнении с группой контроля [10]. Кроме того, в оригинальной работе первооткрывателя нетоза [4] использовали ИЛ-8 в качестве одного из активаторов и зафиксировали формирование НВЛ. Таким образом, полученные результаты вкупе с данными прочих клинических и экспериментальных исследований позволяют считать гибель нейтрофилов путем литического нетоза одной из основных причин увеличения концентрации и усиления эффектов ИЛ-8.

Выводы. Гибель нейтрофильных гранулоцитов путем литического нетоза ассоциирована с увеличением концентрации ИЛ-8 в связи с высвобождением его цитоплазматических запасов, что может сопровождаться нарастанием его эффектов в зоне формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек и прямо зависит от внутриклеточного количества данного цитокина. Данный процесс может способствовать хемотаксису резидентных и циркулирующих лейкоцитов и последующей их активации в данном участке с развитием дополнительного протеолитического и свободнорадикального повреждения тканей.

Список литературы:

1. Abrams S., Morton B., Alhamdi Y., Cheng Z., Lane S., Welters I., Wang G., Toh C.-H. A novel assay of neutrophil extracellular trap (NET) formation identifies anti-IL-8 therapies to reduce disseminated intravascular coagulation and mortality in the intensive care unit. *Clinical Medicine*. 2020. Suppl 2. s114–s115. DOI 10.7861/clinmed.20-2-s114
2. Thiam H.R., Wong S.L., Wagner D.D., Waterman C.M. Cellular Mechanisms of NETosis. *Rev. Cell Dev. Biol.* 2020. 36. 191–218. DOI 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016.
3. Czaikoski P.G., Mota J.M.S.C., Nascimento D.C., Sonogo F., Castanheira F.V. e S., Melo P.H., Scortegagna G.T., Silva R.L., Barroso-Sousa R., Souto F.O., Pazin-Filho A., Figueiredo F., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS ONE*. 2016. 11(2). e148142. DOI 10.1371/journal.pone.0148142.
4. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria *Science*. 2004. 303(5663).1532–1535. DOI 10.1126/science.1092385.

5. Паршина А.А., Цыбиков Н.Н. Влияние нейтрофильных внеклеточных ловушек на коагуляционный гемостаз и фибринолиз у пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника. Забайкальский медицинский вестник. 2019. 4. 90-96.
6. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб. Фолиант. 2018. ISBN 978-5-93929-283-2.
7. Abrams S.T., Morton B., Alhamdi Y., Alsabani M., Lane S., Welters I.D., Wang G., Toh C.-H. A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019. 200 (7). 869–880. DOI 10.1164/rccm.201811-2111OC.
8. Hasler P., Giaglis S., Hahn S. Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly*. 2016. 146. w14352. DOI 10.4414/smw.2016.14352.
9. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., McFadden G., Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular trap. *Cell Host Microbe*. 2013. 13.169–180. DOI 10.1016/j.chom.2013.01.005.
10. Richardson J.J.R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D.R. Neutrophil Extracellular Trap Production in Patients with Colorectal Cancer In Vitro. *International Journal of Inflammation*. 2017. 2017. 4915062. <https://doi.org/10.1155/2017/4915062>.

References:

1. Abrams S., Morton B., Alhamdi Y., Cheng Z., Lane S., Welters I., Wang G., Toh C.-H. A novel assay of neutrophil extracellular trap (NET) formation identifies anti-IL-8 therapies to reduce disseminated intravascular coagulation and mortality in the intensive care unit. *Clinical Medicine*. 2020. Suppl 2. s114–s115. DOI 10.7861/clinmed.20-2-s114.
2. Thiam H.R., Wong S.L., Wagner D.D., Waterman C.M. Cellular Mechanisms of NETosis. *Rev. Cell Dev. Biol*. 2020. 36. 191–218. DOI 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016.
3. Czaikoski P.G., Mota J.M.S.C., Nascimento D.C., Sonogo F., Castanheira F.V. e S., Melo P.H., Scortegagna G.T., Silva R.L., Barroso-Sousa R., Souto F.O., Pazin-Filho A., Figueiredo F., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. *PLoS ONE*. 2016.11 (2). e148142. DOI 10.1371/journal.pone.0148142.
4. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria *Science*. 2004. 303 (5663).1532–1535. DOI 10.1126/science.1092385.
5. Parshina A.A., Tsybikov N.N. Neutrophil extracellular traps impact oncoagulation and fibrinolysis in colon cancer patients. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2019. 4. 90-96.in Russian.
6. Simbirtsev A.S. Cytokines in pathogenesis and treatment of human diseases. SPb. Foliant. 2018. ISBN 978-5-93929-283-2.in Russian.
7. Abrams S.T., Morton B., Alhamdi Y., Alsabani M., Lane S., Welters I.D., Wang G., Toh C.-H. A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019. 200 (7). 869–880. DOI 10.1164/rccm.201811-2111OC.
8. Hasler P., Giaglis S., Hahn S. Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Med Wkly*. 2016. 146. w14352. DOI 10.4414/smw.2016.14352.
9. Jenne C.N., Wong C.H.Y., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., McFadden G., Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular trap. *Cell Host Microbe*. 2013. 13.169–180. DOI 10.1016/j.chom.2013.01.005.
10. Richardson J.J.R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D.R. Neutrophil Extracellular Trap Production in Patients with Colorectal Cancer In Vitro. *International Journal of Inflammation*. 2017. 2017. 4915062. <https://doi.org/10.1155/2017/4915062>.