

ВЛИЯНИЕ МНОГОЭТАПНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИХ КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Швыдченко И.Н.^{1, 2}, Быковская Е.Ю.³, Голубцов В.В.²

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма»,

г. Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,

г. Краснодар, Россия

³ ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края,

г. Краснодар, Россия

Резюме. Несмотря на множество разнообразных методов выделения нейтрофилов из периферической крови, сохраняется актуальной проблема получения достаточного количества жизнеспособной клеточной популяции высокой степени чистоты для количественного определения нейтрофильных цитокинов и экспрессии их мРНК. Рекомендуемые многоэтапные способы очистки нейтрофилов значительно увеличивают по времени продолжительность процесса выделения, могут приводить к активации или апоптозу клеток и сопровождаются их значительными потерями. Наиболее критичным по продолжительности и количеству дополнительных разнообразных манипуляций с клетками является этап предварительной очистки нейтрофилов. В связи с этим актуальным вопросом является сравнение различных методов предварительной изоляции нейтрофилов и выбор наиболее оптимального из них для получения достаточного количества жизнеспособных периферических нейтрофилов, что и явилось целью данной работы. Нами были изучены особенности влияния трех различных протоколов предварительного выделения клеточной взвеси (центрифугирование цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном; центрифугирование цельной крови на двойном градиенте плотности; быстрое выделение лейкоцитов с использованием реагента, способствующего агрегации эритроцитов) на количество и жизнеспособность нейтрофилов, очищенных на заключительном этапе с использованием негативной иммуномагнитной селекции. Установлено, что процедура предварительного выделения нейтрофилов для последующей иммуномагнитной изоляции влияет на их количество и жизнеспособность: максимальное количество жизнеспособных нейтрофилов получается при их выделении традиционным методом центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном. В то же время исследуемые нами три разных метода предварительного выделения нейтрофилов не показали статистически значимых различий по количественному выходу жизнеспособных клеток после иммуномагнитной изоляции, что предполагает использование любого из этих методов в зависимости от возможностей и предпочтений исследователей. В целом наша работа подтверждает данные литературы о том, что многоступенчатый процесс изоляции нейтрофилов позволяет получить клеточную

Адрес для переписки:

Швыдченко Ирина Николаевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
университет физической культуры, спорта и туризма»
350015, Россия, г. Краснодар, ул. Буденного, 161.
Тел.: 8 (918) 456-74-63.
E-mail: irina27shv@gmail.com

Address for correspondence:

Irina N. Shvydchenko
Kuban State University of Education, Sport and Tourism
161 Budenny St
Krasnodar
350015 Russian Federation
Phone: +7 (918) 456-74-63.
E-mail: irina27shv@gmail.com

Образец цитирования:

И.Н. Швыдченко, Е.Ю. Быковская, В.В. Голубцов
«Влияние многоэтапной изоляции нейтрофилов
на их количество и жизнеспособность» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

© Швыдченко И.Н. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.N. Shvydchenko, E.Yu. Bykovskaya, V.V. Golubtsov "Effect
of multistage isolation of neutrophils on their counts and
viability", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

© Shvydchenko I.N. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

взвесь высокой степени чистоты (> 99,1%), которую можно использовать в дальнейшем для исследования их цитокин-секретирующей активности. Однако такая многоступенчатая изоляция значительно снижает количество нейтрофилов, что может быть критичным при исходно малых объемах крови.

Ключевые слова: нейтрофилы, цитокин-секретирующая активность, изоляция, градиентное центрифугирование, иммуномагнитная селекция, декстран, гидроксипропилкрахмал

EFFECT OF MULTISTAGE ISOLATION OF NEUTROPHILS ON THEIR COUNTS AND VIABILITY

Shvydchenko I.N.^{a, b}, Bykovskaya E.Yu.^c, Golubtsov V.V.^b

^a Kuban State University of Education, Sport and Tourism, Krasnodar, Russian Federation

^b Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^c Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Despite numerous separation methods of neutrophils from peripheral blood, isolation of sufficient quantities of high-purity viable cells for quantitative determination of neutrophil cytokines and their mRNA expression still remains an actual issue. The recommended multi-step purification methods significantly prolong the cell isolation process, potentially leading to cell activation or apoptosis and resulting in significant cell loss. Preliminary purification of neutrophils is the most critical stage in terms of time spent, and several additional manipulations with cells. To address this challenge, our study aimed to compare various methods of preliminary neutrophil isolation in order to select the optimal approach to obtaining a sufficient number of viable peripheral neutrophils.

We studied the effects of three different protocols for preliminary isolation of cell suspensions: (a) centrifugation of whole blood at a single-step density gradient followed by sedimentation of red blood cells with dextran; (b) centrifugation of whole blood on a double density gradient; (c) rapid isolation of leukocytes using a reagent that promotes red blood cell aggregation. The cell counts and viability of purified neutrophils were tested at the final stage using negative immunomagnetic selection. Our study has shown that the methods used for preliminary neutrophil isolation significantly affect both the number and viability of the cells. The highest number of viable neutrophils was obtained using a conventional method of blood centrifugation at a density gradient followed by dextran sedimentation of red blood cells. However, the three studied methods of preliminary neutrophil isolation did not show statistically significant differences with respect to quantitative yield of viable cells after immunomagnetic isolation. These findings suggest that any of these methods may be applied, depending on capabilities and preferences of the researchers. In summary, our findings confirm previous studies indicating that the multistep process of neutrophil isolation allows for obtaining a high-purity cell suspension (> 99.1%) which can be used in future studies of their cytokine-secreting activity. However, such multi-stage isolation significantly reduces the yield of neutrophils, thus being critical for studying of initially small blood volumes.

Keywords: neutrophils, cytokine-secreting activity, isolation, gradient centrifugation, immunomagnetic selection, dextran, hydroxyethyl starch

Работа была частично поддержана грантом РФФИ и Министерством образования и науки Краснодарского края, № 16-44-230391p_a.

Введение

Функционирование нейтрофилов, количественно преобладающей популяции лейкоцитов в острой фазе развития воспаления, имеет критическое значение в антибактериальной защите [9, 28, 33, 34]. Наряду с эфферентными функциями

нейтрофилы являются важным фактором регуляции врожденного и адаптивного иммунитета, благодаря своей способности синтезировать и секретировать широкий спектр цитокинов и хемокинов. Цитокин-продуцирующая активность нейтрофилов обеспечивает также их функциональное участие в различных физиологических и патологических процессах, таких как кроветворение, ангиогенез, тканевая репарация, аутоиммунные и опухолевые заболевания [11, 13, 17, 29, 30, 31, 32].

В настоящее время методология исследований цитокин-секретирующей функции нейтрофилов широко описана в научной литературе [43]. При этом сохраняется актуальной проблема стандартизации и валидации методов выделения жизнеспособной клеточной взвеси для количественного определения нейтрофильных цитокинов.

Изучение нейтрофилов периферической крови *ex vivo* всегда сталкивается с методологическими проблемами, обусловленными их физиологическими особенностями, такими как ограниченная продолжительность жизни и невозможность длительного культивирования *in vitro*, вследствие нахождения на терминально дифференцированной стадии клеточного развития [6, 42]. Кроме того, нейтрофилы являются чрезвычайно чувствительными клетками и активируются при воздействии практически любых физико-химических раздражителей и даже следовых количеств таких агентов, как липополисахарид (ЛПС). В связи с этим процесс выделения нейтрофилов из периферической крови должен быть по возможности очень быстрым и проходить с тщательно подобранными условиями (апиrogenная посуда и реагенты, полипропиленовые пробирки, физиологическое рН среды и отсутствие двухвалентных катионов, температура, параметры центрифугирования и пр.) для исключения искусственной активации и/или апоптоза клеток [7, 21, 24, 26].

Кроме ограниченной жизнеспособности и потенциальной возможности активации и/или апоптоза нейтрофилов в процессе выделения при изучении механизмов нейтрофильной секреции цитокинов и экспрессии их мРНК перед исследователями встает еще одна не менее важная проблема, связанная с чистотой выделенной нейтрофильной взвеси. Данная проблема обусловлена тем, что нейтрофилы человека содержат в 10–20 раз меньше общей РНК, чем другие лейкоциты [44], и, соответственно, в пересчете на одну клетку обычно секретируют чрезвычайно мало цитокинов, в отличие от основных продуцентов — моноцитов/макрофагов, лимфоцитов или дендритных клеток [46, 50]. Установлено, что 1% мононуклеарных клеток в нейтрофильной взвеси дает 30% контаминирующей РНК [44]. Исключения составляют такие цитокины, как антагонист рецептора интерлейкина 1 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra), В-клеточный активирующий фактор (B-cell activating factor, BAFF), фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), и хемокиновые (C-C) лиганды 19 и 23 (chemokine (C-C motif) ligand, CCL19, CCL23), секреция которых нейтрофилами может быть довольно значительной [4, 38, 39, 40]. В связи с этим показано, что для правильной и надежной количественной оценки профилей продуциру-

емых цитокинов, или генов, экспрессируемых нейтрофилами в состоянии покоя или при их активации, обязательна работа с клеточными популяциями чрезвычайно высокой чистоты [12, 43].

Самым первым и наиболее распространенным из известных методов выделения нейтрофилов является метод, предложенный в 1968 г. Boyum A. и соавт. [10], который был в последующем модифицирован Ferrante A. и Thong Y.H. (1980) [16]. Процедура состоит из наложения цельной крови на среду с градиентом плотности раствора полисахарида, центрифугирования, отделения слоя нейтрофилов от эритроцитов при помощи декстрановой седиментации и лизиса остаточных эритроцитов. Принцип данного метода лежит в основе разнообразных последующих модификаций, включающих, в том числе использование двойного градиента плотности для более быстрого и чистого отделения нейтрофилов [1, 2, 3, 14, 18]. Одностадийное центрифугирование цельной крови на градиенте плотности с использованием коммерчески доступных сред, таких как Фиколл-Пак (Ficoll-Paque) или Полиморфпреп (Polymorphprep), представляющих собой смесь метризоата натрия и декстрана, позволяет получить нейтрофилы с чистотой клеточной взвеси приблизительно 94–98% [15, 27, 35]. Достаточно низкий процент (2–6%) контаминирующих клеток, присутствующих в суспензиях нейтрофилов после использования методов изоляции на градиенте плотности, часто считается приемлемым уровнем загрязнения для большинства исследований, связанных с изучением их реактивности. В то же время данный уровень загрязнения представляет собой потенциальную проблему при количественном изучении цитокин-секретирующей функции нейтрофилов с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и таких высокотехнологических методов, как количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) или секвенирование РНК (RNA-Seq).

Основными контаминирующими клетками в нейтрофильной взвеси, выделенной с помощью градиентного центрифугирования, являются эозинофилы и лимфоциты, в меньшей степени — моноциты и другие гранулоциты [25, 47]. Уровень лейкоцитарной контаминации, кроме того, зависит от донора и часто также от технических навыков исследователя. Показано, что процент контаминирующих клеток в препаратах нейтрофилов, выделенных с использованием Polymorphprep, может варьировать от 1% до 17% в отдельных образцах крови здоровых людей [15].

Современные методы иммуномагнитной изоляции с использованием магнитных наночастиц, связанных с моноклональными антителами к нейтрофильным маркерам (позитивная иммуно-

магнитная селекция), или антителами к маркерам контаминирующих лейкоцитов (негативная иммуномагнитная селекция) позволяют быстро получать обогащенную нейтрофильную клеточную взвесь высокой степени чистоты [6, 25, 26]. В настоящее время использование негативной иммуномагнитной селекции нейтрофилов является общепризнанным подходом при проведении исследований, связанных с изучением нейтрофильной секреции цитокинов и экспрессии их мРНК [12, 43, 44, 45]. Различные коммерческие одноэтапные наборы, предназначенные для быстрой иммуномагнитной изоляции периферических нейтрофилов, в своих технических описаниях указывают чистоту нейтрофильной взвеси в диапазоне 98-99%. Однако даже такая чистота клеточной взвеси не всегда гарантирует отсутствие ложноположительных результатов. Так, анализируя экспрессию мРНК и продукцию цитокинов в ответ на R848 (синтетический имитатор вирусной одноцепочечной РНК, распознаваемой Toll-подобным рецептором (TLR) 8) нейтрофилами, выделенными с использованием метода одноэтапной иммуномагнитной очистки, F. Calzetti и соавт. (2017) получили много ложноположительных результатов, наиболее значимыми из которых являются продукция IL-10 и экспрессия IL-6 мРНК, источником которых, как выяснили авторы, оказались не нейтрофилы, а контаминирующие $\text{slan}^+\text{CD16}^+$ моноциты, присутствующие в клеточной взвеси в очень малом количестве (0,1%-0,6%) [12].

Значительную роль в «вопросе нейтрофильной контаминации» при оценке цитокин-секретирующей функции нейтрофилов играют стимулирующие условия. Показано, что процесс одноэтапной быстрой иммуномагнитной очистки оказывается вполне достаточным в отношении аккумуляции и продукции мРНК IL-8 или экспрессии мРНК фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor α , TNF α) при инкубации нейтрофилов с TNF α . А наиболее строгие требования к чистоте клеточной взвеси предъявляются при стимуляции нейтрофильных популяций агонистами TLRs [43]. В связи с этим в таких экспериментах настоятельно рекомендуется многоэтапная очистка нейтрофилов с предварительным выделением нейтрофильной взвеси на градиенте плотности и последующим этапом иммуномагнитной изоляции [12, 43].

Критическим моментом многоступенчатой очистки является появление дополнительных разнообразных манипуляций с клетками, что увеличивает по времени продолжительность процесса выделения и может влиять на жизнеспособность нейтрофилов и их активационный статус, приводя в итоге к значительной потере клеток.

В связи с этим актуальным вопросом является сравнение различных методов предварительной изоляции нейтрофилов и выбор наиболее оптимального из них для получения достаточного количества жизнеспособных периферических нейтрофилов, что и явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Примечание: нейтрофилы были выделены из венозной крови здоровых доноров. Доноров крови невозможно было идентифицировать, не было никакого взаимодействия с живыми людьми или знания идентифицируемой личной информации.

Донорская кровь в вакуумных одноразовых пробирках с ЭДТА доставлялась в лабораторию не позднее 2-3 часов после ее забора. Процедуры по изоляции нейтрофилов проводили с использованием стерильных растворов, посуды и расходных материалов, полипропиленовых пробирок. Перед проведением негативной иммуномагнитной селекции обогащенную нейтрофилами клеточную взвесь выделяли из цельной крови, используя три различных протокола, а именно: 1) центрифугирование цельной крови на одинарном градиенте плотности (1,077 г/мл) с последующим осаждением эритроцитов декстраном — NeuG1/D; 2) центрифугирование цельной крови на двойном градиенте плотности (1,119/1,077 г/мл) — NeuG2; 3) быстрое выделение лейкоцитов с использованием реагента, способствующего агрегации эритроцитов, HetaSep (StemCell Technologies, Канада, #07906) — NeuHS.

1) Выделение нейтрофилов центрифугированием цельной крови на одинарном градиенте плотности (1,077 г/мл) с последующим осаждением эритроцитов декстраном (NeuG1/D), проводили с использованием модифицированного протокола, любезно предоставленного д-ром Federica Calzetti (Университет Вероны, Верона, Италия). Венозную кровь, предварительно разбавленную фосфатно-солевым раствором Дульбекко (DPBS, Gibco, #14190169) в соотношении 4 части крови к 1 части DPBS, наслаивали на Гистопак-1077 (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, США, #10771) в соотношении 4:3. Центрифугировали при 400 × g 30 мин при комнатной температуре. После удаления слоя мононуклеарных клеток собирали нейтрофилы, лежащие на поверхности эритроцитов, в пробирку, содержащую 5 мл DPBS. Клетки осаждали центрифугированием при 250 × g 5 мин при комнатной температуре, удаляли супернатант. Добавляли к осадку 8 мл DPBS и 2 мл 4%-ного раствора декстрана 500 (Sigma-Aldrich, США, #31392) в DPBS. Осторожно перемешивали переворачиванием пробирки и оставляли клеточную взвесь на 20-30 мин при комнатной температуре для седиментации эри-

троцитов. Обогащенный гранулоцитами супернатант переносили в новую пробирку и осаждали центрифугированием при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре. Контаминирующие эритроциты удаляли осмотическим лизисом: клеточный осадок ресуспендировали в 1,5 мл 0,2% NaCl; осторожно перемешивали не более 50–60 сек, затем добавляли 4,5 мл 1,2% NaCl (растворы NaCl готовили из 5M NaCl Sigma, США, #s6316) и DPBS до 12 мл, центрифугировали при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре и удаляли супернатант. При необходимости процедуру повторяли. Ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл среды DPBS с 2% эмбриональной телячьей сывороткой (2%FCS) (StemCell Technologies, Канада, #07905) и 2мМ EDTA (Sigma-Aldrich, США, #ED2P).

2) Выделение нейтрофилов (гранулоцитов) центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности (NeuG2) проводили согласно инструкции к Гистопак-1119 (Histopaque-1119, Sigma-Aldrich, США, #11191). В пробирку в соотношении 1:1:2 последовательно наслаивали Гистопак-1119, Гистопак-1077 и венозную кровь, предварительно разбавленную DPBS (1:1). Центрифугировали 40 мин при $400 \times g$ при комнатной температуре. После удаления слоя мононуклеарных клеток, на границе между двумя градиентами плотности собирали нейтрофильное «кольцо» в пробирку, содержащую 5 мл DPBS. Клетки осаждали центрифугированием при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре, удаляли супернатант, повторно отмывали в 5 мл DPBS с последующим центрифугированием и удалением супернатанта. При неполном осаждении эритроцитов, проводили их удаление при помощи осмотического лизиса, аналогично способу, описанному выше. Ресуспендировали клеточный осадок в среде DPBS + 2%FCS + 2мМ EDTA.

3) Быстрое выделение лейкоцитов с использованием HetaSep (NeuHS). Данный метод рекомендуется производителями набора для негативной иммуномагнитной селекции нейтрофилов (StemCell Technologies, Канада). HetaSep содержит 6%-ный раствор гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), стимулирующий агрегацию эритроцитов, и используется для быстрого отделения ядросодержащих клеток от эритроцитов в цельной крови. Согласно инструкции производителя, добавляли 2 мл HetaSep к 10 мл цельной крови (1:5) в 15-мл полипропиленовую пробирку и хорошо перемешивали. Центрифугировали при $110 \times g$ 6 мин при комнатной температуре. Оставляли на 10–15 мин для дальнейшего осаждения эритроцитов. Удаляли обогащенный лейкоцитами слой плазмы (приблизительно 40% объема) в другую пробирку и промывали, добавляя 4 части DPBS

на 1 часть плазмы с клетками. Центрифугировали при $500 \times g$ 10 мин при комнатной температуре. Удаляли супернатант, отмывали клетки для удаления тромбоцитов, добавляя 5 мл DPBS и центрифугируя при $120 \times g$ 10 мин при комнатной температуре. После удаления надосадочной жидкости остаточные эритроциты удаляли осмотическим лизисом, аналогично способу, описанному в первом протоколе. Ресуспендировали клеточный осадок в среде DPBS + 2%FCS + 2мМ EDTA.

Клеточная взвесь, выделенная одним из указанных выше способов, на следующем этапе подвергалась негативной иммуномагнитной селекции, которую проводили в соответствии с инструкцией производителя, используя набор для обогащения нейтрофилов человека EasySep Human Neutrophil Enrichment Kit (StemCell Technologies, Канада, #19257) и магнит PURPLE EASYSEP® MAGNET (StemCell Technologies, Канада, #18000). Набор содержит покрытые декстраном магнитные наночастицы и комбинацию моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток крови человека (CD2, CD3, CD9, CD19, CD36, CD56, гликофорин A), биспецифичных к декстрану, что позволяет обеспечить «сшивку» контаминирующих клеток с магнитными наночастицами и их последующее «прилипание» к стенкам пробирки, помещенной в магнит. Очищенная таким образом от контаминирующих клеток нейтрофильная взвесь переносится в чистую пробирку.

Подсчет выделенных нейтрофилов с одновременной оценкой их жизнеспособности методом эксклюзии трипанового синего на автоматическом анализаторе клеток TC20 (Bio-Rad, США) осуществляли до и после иммуномагнитной изоляции. Количество клеток пересчитывали на 1 мл цельной крови, используемой для выделения нейтрофилов.

Чистоту клеточной взвеси после многоэтапного выделения оценивали с помощью FACS-окрашивания клеток на проточном цитофлюориметре BD FACSCanto II с флуоресцентно конъюгированными антителами к CD66b (BD Biosciences, США, #560995) и CD16 (BD Biosciences, США, #561927).

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). В связи с отсутствием нормального распределения данных в соответствии с критерием Шапиро–Уилка, центральные тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой (Me) и интерквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием непараметрических критериев

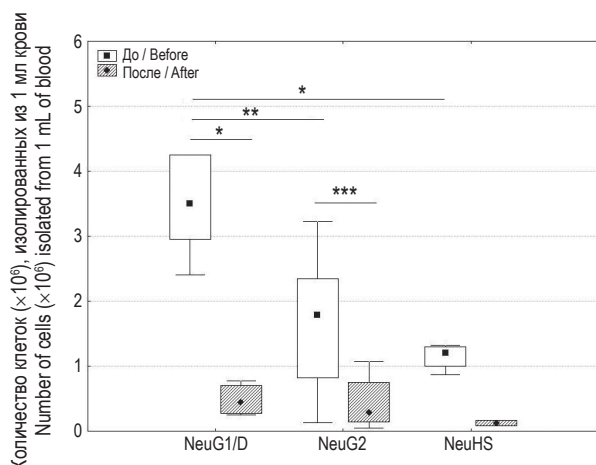


Рисунок 1. Количество нейтрофилов до и после отрицательной иммуномагнитной селекции в зависимости от разных методов предварительной изоляции клеточной взвеси

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала. NeuG1/D – нейтрофилы, выделенные центрифугированием цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном; NeuG2 – нейтрофилы, выделенные центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности; NeuHS – нейтрофилы (лейкоциты), выделенные с использованием HetaSep.

Figure 1. Number of neutrophils before and after negative immunomagnetic selection depending on different methods of preliminary isolation of cell suspension

Note. Data are presented as median and interquartile range. NeuG1/D, neutrophils isolated by centrifugation of whole blood on a single density gradient followed by sedimentation of red blood cells with dextran; NeuG2, neutrophils isolated by centrifugation of whole blood on a double density gradient; NeuHS, neutrophils (leukocytes) isolated using HetaSep.

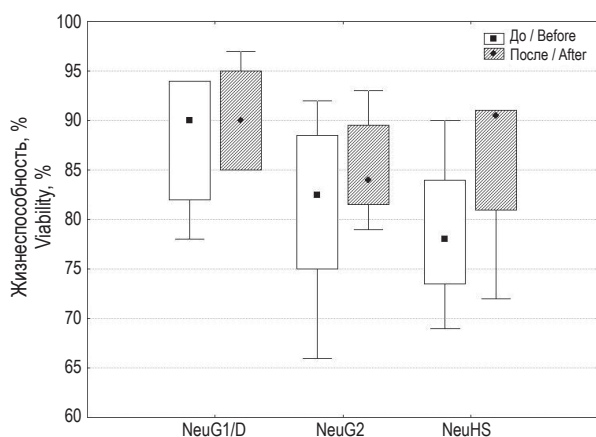


Рисунок 2. Жизнеспособность нейтрофилов до и после отрицательной иммуномагнитной селекции в зависимости от разных методов предварительной изоляции клеточной взвеси

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Viability of neutrophils before and after negative immunomagnetic selection depending on different methods of preliminary isolation of cell suspension

Note. As for Figure 1.

Краскела–Уоллиса для множественных сравнений и Манна–Уитни для сравнения независимых переменных попарно. Непараметрический критерий Вилкоксона использовали для сравнения связанных выборок (до и после иммуномагнитной изоляции). Наблюдаемые различия считались не случайными при $p < 0,05$.

Результаты

В первой серии экспериментов на большом количестве образцов крови была проведена сравнительная оценка влияния трех различных протоколов предварительной изоляции нейтрофилов на их количество и жизнеспособность. Анализ полученных результатов показал, что максимальное количество нейтрофилов получается при их выделении методом центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном (NeuG1/D). Количество нейтрофилов NeuG1/D превышало в 2,07 раза ($p < 0,05$) количество клеток, выделенных с использованием двойного градиента плотности (NeuG2), и в 2,67 раза ($p < 0,05$) – с применением HetaSep (NeuHS). Кроме того, нейтрофилы NeuG1/D имели повышенную жизнеспособность (все $p < 0,05$) по сравнению с нейтрофилами NeuG2 и NeuHS (табл. 1).

Во второй серии экспериментов мы оценивали влияние исследуемых протоколов предварительного выделения нейтрофилов на их количество и жизнеспособность до и после проведения последующей иммуномагнитной изоляции. Аналогично первой серии экспериментов максимальное количество нейтрофилов на предварительном этапе очистки было получено при их выделении с использованием протокола центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном: количество нейтрофилов NeuG1/D превышало в 1,96 раза ($p < 0,05$) количество нейтрофилов NeuG2, выделенных на двойном градиенте плотности, и в 2,92 раза ($p < 0,05$) – количество клеток NeuHS, выделенных при помощи HetaSep (табл. 2). После проведения иммуномагнитной изоляции количество нейтрофилов во всех трех исследуемых группах значительно уменьшилось: NeuG1/D – в 7,8 раза ($p < 0,05$), NeuG2 – в 6,7 раза ($p < 0,05$), NeuHS – в 10 раз ($p = 0,0679$). Несмотря на то, что количество нейтрофилов, выделенных на предварительном этапе с использованием первого протокола (с декстраном), после иммуномагнитной очистки также существенно превышало количество нейтрофилов, изолированных двумя другими методами, статистически значимые различия между группами по данному параметру отсутствовали (табл. 2, рис. 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИХ КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF PRELIMINARY ISOLATION OF NEUTROPHILS ON THEIR NUMBER AND VIABILITY, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	NeuG1/D n = 18 (1)	NeuG2 n = 59 (2)	NeuHS n = 7 (3)	p (Kruskal–Wallis ANOVA)	p (Mann–Whitney U Test)		
					1 ↔ 2	1 ↔ 3	2 ↔ 3
Количество клеток, выделенных из 1 мл крови ($\times 10^6$) Number of cells isolated from 1 mL of blood ($\times 10^6$)	2,75 (2,08–3,20)	1,33 (1,05–1,83)	1,03 (0,83–1,56)	0,0000	0,0000	0,0009	0,2834
Жизнеспособность, % Viability, %	87,5 (82,0–92,0)	84,0 (73,0–88,0)	78,0 (76,0–81,0)	0,0191	0,0182	0,0100	0,3169

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ВЗВЕСИ НА КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ДО И ПОСЛЕ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕЛЕКЦИИ, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

TABLE 2. INFLUENCE OF DIFFERENT METHODS OF PRELIMINARY ISOLATION OF CELL SUSPENSION ON THE NUMBER AND VITABILITY OF NEUTROPHILS BEFORE AND AFTER IMMUNOMAGNETIC SELECTION, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator		NeuG1/D n = 6 (1)	NeuG2 n = 16 (2)	NeuHS n = 4 (3)	p (Kruskal–Wallis ANOVA)	p (Mann–Whitney U Test)		
						1 ↔ 2	1 ↔ 3	2 ↔ 3
Количество клеток, выделенных из 1 мл крови ($\times 10^6$) Number of cells isolated from 1 mL of blood ($\times 10^6$)	До Before	3,50 (2,95–4,25)	1,79 (0,82–2,34)	1,20 (1,00–1,30)	0,0036	0,0017	0,0105	0,4497
	После After	0,45 (0,28–0,70)	0,29 (0,18–0,63)	0,12 (0,08–1,70)	0,0870			
p (Wilcoxon Matched Pairs Test)		0,0277	0,0005	0,0679				
Жизнеспособность, % Viability, %	До Before	90,00 (82,00–94,00)	82,50 (75,00–88,50)	78,00 (73,50–84,00)	0,1262			
	После After	90,00 (85,00–95,00)	84,00 (81,50–89,50)	90,50 (81,00–91,00)	0,0894			
p (Wilcoxon Matched Pairs Test)		0,1730	0,2209	0,2851				

В отличие от количественного содержания жизнеспособность нейтрофилов не только сохранилась на высоком уровне у нейтрофилов NeuG1/D, но и наблюдались тенденции к ее повышению в двух других группах, особенно у нейтрофилов NeuHS после иммуномагнитной изоляции (рис. 2), в результате чего во второй серии экспериментов статистически значимые разли-

чия между группами по данному показателю также отсутствовали (табл. 2).

Независимо от способа предварительного выделения нейтрофилов, проведение многоэтапной очистки с использованием на заключительной стадии метода негативной иммуномагнитной селекции позволило получить клеточную взвесь высокой степени чистоты: содержание нейтро-

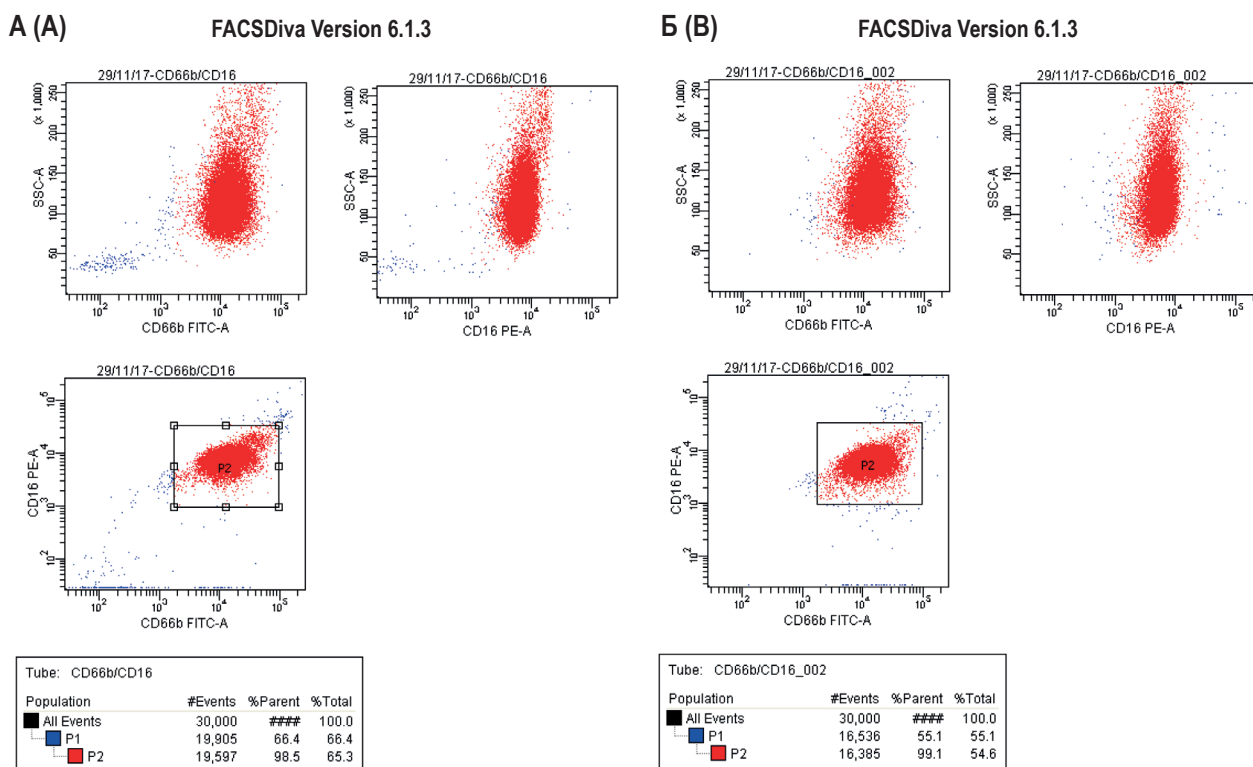


Рисунок 3. Оценка гомогенности нейтрофильной популяции методом проточной цитофлуориметрии

Примечание. Приведены данные для клеточной взвеси, полученной до (А) и после (Б) проведения отрицательной иммуномагнитной селекции. Внизу справа показана чистота обогащенной нейтрофильной взвеси: количество CD16⁺CD66b⁺ нейтрофилов составляет 98,5% до проведения иммуномагнитной селекции (А) и 99,1% – после (Б). CD16 и CD66b – специфические поверхностные маркеры нейтрофилов человека.

Figure 3. Assessment of homogeneity of the neutrophil population by flow cytometry

Note. Data are presented for the cell suspension obtained before (A) and after (B) negative immunomagnetic selection. The bottom right shows the purity of enriched neutrophil suspension: the number of CD16⁺CD66b⁺ neutrophils is 98.5% before immunomagnetic selection (A) and 99.1% after (B). CD16 and CD66b are specific surface markers of human neutrophils.

филов в обогащенной фракции превышало 99,1% (рис. 3).

Обсуждение

В данной работе мы сравнивали три различных способа предварительного выделения нейтрофилов: традиционный метод центрифугирования цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном – NeuG1/D; выделение нейтрофилов центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности – NeuG2; быстрое выделение лейкоцитов с использованием NetaSep – NeuHS.

Анализ полученных результатов показал, что максимальное количество жизнеспособных клеток на предварительном этапе получается при выделении нейтрофилов с использованием одинарного градиента плотности и декстрана (NeuG1/D). После проведения дополнительной очистки нейтрофильной взвеси от контаминирующих клеток с помощью негативной иммуно-

магнитной селекции количество нейтрофилов значительно уменьшилось, независимо от используемого протокола их предварительного выделения. Тенденции к повышенному содержанию NeuG1/D сохранились, однако статистических различий между группами при окончательной оценке числа нейтрофилов обнаружено не было.

Точный механизм существенного уменьшения количества нейтрофилов после проведения негативной иммуномагнитной селекции при многоэтапной очистке неизвестен. Сравнительный анализ, проведенный V. Kremer и соавт. (2023), показывает, что одноэтапная негативная иммуномагнитная изоляция нейтрофилов дает наибольший выход клеток на 1 мл крови по сравнению с методами, использующими разные режимы градиентного центрифугирования [25], а также является наиболее быстрым и щадящим методом выделения нейтрофилов [6]. И хотя есть сведения о том, что данный метод ускоряет апоптоз нейтрофилов, это наблюдается только через 24 ч культивирования [20]. Наши результаты так-

же не подтверждают снижение жизнеспособности нейтрофилов.

Можно предположить, что причиной существенного уменьшения количества нейтрофилов при многоэтапной очистке является их активация в процессе предварительного выделения и последующее удаление при иммуномагнитной изоляции, вследствие возможного неспецифического связывания с магнитными наночастицами.

Влияние процесса выделения нейтрофилов на их функциональный статус широко описано в литературе. Уровень активации и дегрануляции нейтрофилов сильно коррелирует с количеством этапов и типами манипуляций, используемых во время выделения [14].

Известно, что методы выделения нейтрофилов на одинарном или двойном градиенте плотности с помощью центрифугирования дают самый высокий уровень их активации и дегрануляции [6, 14, 25, 49]. Нейтрофилы, изолированные с помощью градиентного центрифугирования, характеризуются отчетливым паттерном экспрессии нескольких маркеров, связанных с активацией, а именно — повышенной экспрессией CD11b (альфа-субъединица интегрина $\alpha M\beta 2$, MAC-1), CD63 (мембранный маркер азурофильных гранул), CD66b (гранулоцит-специфический маркер), CD177 (специфический маркер нейтрофильной активации), FPR1 (рецептор формилпептида-1), CD35 (рецептор комплемента-1) и CD32 (Fc γ -рецептор II, Fc γ RII), снижением уровня CD62L (L-селектин), CD16 (низко-аффинный Fc γ -рецептор III, Fc γ RIII), и BLTR1 (лейкотриена B4 рецептор-1) [6, 14, 25]. Кроме того, установлено, что нейтрофилы, выделенные на градиенте плотности, экспрессируют несколько атипичных маркеров, таких как CD11c (альфа-субъединица интегрина $\alpha X\beta 2$), CXCR3 и CXCR4 (хемокиновые рецепторы), FPR2 (рецептор формилпептида-2), CD14 (коррецептор TLR4) и антигенпрезентирующие молекулы HLA-DR и HLA-DQ, обычно отсутствующих на нейтрофилах, изолированных более щадящим иммуномагнитным методом [6].

Активация и дегрануляция нейтрофилов при центрифугировании на градиенте плотности может в свою очередь способствовать их неспецифическому связыванию с антителами и последующее удаление в процессе иммуномагнитной изоляции. Нейтрофилы содержат большое количество катионных белков, включая миелопероксидазу и дефенсину [8], которые могут опосредовать неспецифические связывающие взаимодействия с анионными областями конструкций антител [14, 23, 37, 41]. Еще одним из механизмов потери клеток в процессе иммуномагнитной изоляции нейтрофилов при много-

этапном выделении может быть их способность легко формировать комплексы с другими типами лейкоцитов, образуя нейтрофил-лейкоцитарные мультиплеты. Показано, что изоляция нейтрофилов с использованием как одинарного, так и двойного градиента плотности может увеличивать частоту образования мультиплетов на 46–73% [14].

Применение декстрана для седиментации эритроцитов (в первом протоколе) также может быть одной из причин потери клеток в процессе иммуномагнитной изоляции. Установлено, что седиментация эритроцитов с декстраном при выделении нейтрофилов стимулирует дегрануляцию специфических гранул, увеличивает экспрессию поверхностных молекул CD11b и CD16, усиливает адгезию и оксидазную активность, снижая при этом хемотаксис нейтрофилов [5, 36, 49]. Интересно, что стимулирующий эффект декстрана авторы наблюдали только тогда, когда седиментация эритроцитов предшествовала градиентному центрифугированию нейтрофилов, при проведении данных этапов в обратном порядке активирующего воздействия декстрана на нейтрофилы не обнаруживалось [5, 36]. Считается, что декстран оказывает опосредованное действие на нейтрофилы через активацию моноцитов и высвобождение ими TNF α [36], поэтому его активирующее влияние на нейтрофилы минимально в отсутствие моноцитов. В нашей работе мы проводили седиментацию с декстраном после градиентного центрифугирования, что должно было минимизировать активирующее влияние декстрана на нейтрофилы, опосредованное моноцитами. Однако не исключены стимулирующие эффекты градиентного центрифугирования, наличие контаминирующих моноцитов, а также вероятность неспецифических взаимодействий, обусловленных декстраном. Необходимо отметить, что декстран является важным компонентом набора для негативной иммуномагнитной селекции, и производитель (StemCell Technologies) не рекомендует использовать декстран в качестве седиментирующего эритроциты агента при подготовке клеточной взвеси.

Использование на предварительном этапе выделения нейтрофилов эритроцит-агрегирующего агента HetaSep (рекомендованного StemCell Technologies) также не обеспечило высокого выхода нейтрофилов после иммуномагнитной изоляции. В отличие от градиентного центрифугирования, при помощи данного метода изначально выделяется не нейтрофильная, а лейкоцитарная взвесь. Несмотря на довольно быструю процедуру, причиной потери клеток здесь также может быть их неспецифическое связывание с антителами вследствие активации. В данном случае

стимулирующим эффектом может обладать гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), основной компонент HetaSep, несмотря на противоречивость сведений о его специфических влияниях на нейтрофилы. Известно, что ГЭК ингибирует адгезию нейтрофилов и трансэндотелиальную миграцию [19], но вызывает высвобождение эластазы [22]. На основании экспериментальных данных предполагают, что ГЭК может вести себя как физиологический субстрат для интегринов (MAC-1). Более того, связывание ГЭК с MAC-1 может активировать внутриклеточные сигнальные каскады (ГЭК способен активировать путь PI3K/Akt, не влияя на p38/MAPK), модулирующие ответы нейтрофилов, такие как жизнеспособность и окислительный «взрыв» [48]. Дополнительным негативным моментом при использовании этого метода является необходимость неоднократного проведения осмотического лизиса остаточных эритроцитов, количество которых оказывается довольно существенным (согласно инструкции производителя до 5-10% исходных эритроцитов могут не осаждаться и, таким образом, все еще оставаться в лейкоцитарной фракции). Лизис эритроцитов может провоцировать нейтрофилы к неспецифическому связыванию антител [14, 25].

В целом наша работа подтверждает данные литературы [12, 43, 44, 45] о том, что многоступенчатый процесс изоляции нейтрофилов позволяет получить клеточную взвесь высокой степени чистоты, которую можно использовать в дальнейшем для исследования их цитокин-секретирующей активности. Однако такая много-

ступенчатая изоляция значительно снижает их количество, что может быть критичным при исходно малых объемах крови. Исследуемые нами три разных метода предварительного выделения нейтрофилов не показали статистически значимых различий по количественному выходу жизнеспособных нейтрофилов после иммуномагнитной изоляции, что предполагает использование любого из этих методов в зависимости от возможностей и предпочтений исследователей. Тем не менее, основываясь на собственных полученных результатах, можно сделать вывод о том, что предварительная очистка нейтрофилов методом центрифугирования на одинарном градиенте плотности с последующей седиментацией эритроцитов декстраном, несмотря на все ее недостатки, обладает наиболее щадящим воздействием на клетки, что подтверждается повышенным выходом жизнеспособных нейтрофилов на этапе предварительного выделения и после иммуномагнитной очистки. Кроме того, этот метод является наиболее экономичным, из рассмотренных нами, в плане трудозатрат, времени и стоимости реактивов.

Благодарности

Авторы выражают огромную благодарность профессору Марко Кассателла (Marco A. Cassatella) и доктору Фредерике Калзетти (Federica Calzetti) из Университета Вероны (Верона, Италия) за предоставленный подробный протокол экспериментального выделения нейтрофилов и ценные практические советы.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И., Рыжкова А.И., Савочкина А.Ю., Шишкова Ю.С. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови. Патент RU 2431836 C1, 20.10.2011. [Dolgushin I.I., Ryzhkova A.I., Savochkina A.Yu., Shishkova Yu.S. Method for isolating neutrophil granulocytes from peripheral blood. Patent RU 2431836 C1, October 20, 2011].
2. Ковальчук Л.В. Иммунология. Практикум / Под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатъевой, Л.В. Ганковской. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 176 с. [Kovalchuk L.V. Immunology. Workshop. Eds. L.V. Kovalchuk, G.A. Ignatieva, L.V. Gankovskaya]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 176 p.
3. Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Трофименко А.С., Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Спицина С.С., Зборовская И.А. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из крови с использованием двухступенчатого градиента плотности йогексола. Патент RU 2739324 C1, 22.12.2020. [Mamus M.A., Tikhomirova E.A., Trofimenko A.S., Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Spitsina S.S., Zborovskaya I.A. Method for isolating neutrophil granulocytes from blood using a two-step density gradient iohexol. Patent RU 2739324 C1. December 22, 2020].
4. Arruda-Silva F, Bianchetto-Aguilera F, Gasperini S, Polletti S, Cosentino E, Tamassia N, Cassatella M.A. Human neutrophils produce CCL23 in response to various TLR-agonists and TNFalpha. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, 176. doi: 10.3389/fcimb.2017.00176.
5. Berends C., Dijkhuizen B., de Monchy J.G., Gerritsen J., Kauffman H.F. Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. *J. Immunol. Methods*, 1994, Vol. 167, no 1-2, pp. 183-193.
6. Blanter M., Cambier S., De Bondt M., Vanbrabant L., Pörtner N., Salama S.A., Metzemaekers M., Marques P.E., Struyf S., Proost P., Gouwy M. Method matters: effect of purification technology on neutrophil phenotype and function. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 820058. doi: 10.3389/fimmu.2022.820058.
7. Blanter M., Gouwy M., Struyf S. Studying neutrophil function in vitro: cell models and environmental factors. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 141-162.

8. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, Vol.89, no 10, pp. 3503-3521.
9. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010, Vol. 33, no. 5, pp. 657-670.
10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, Suppl. 97, pp. 77-89.
11. Burn G.L., Foti A., Marsman G., Patel D.F., Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity*, 2021, Vol. 54, Iss. 7, pp. 1377-1391.
12. Calzetti F., Tamassia N., Arruda-Silva F., Polletti S., Cosentino E., Tamassia N., Cassatella M.A. The importance of being “pure” neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, pp. 352-355.
13. Cassatella M.A., Östberg N.K., Tamassia N., Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 7, pp. 648-664.
14. Connelly A.N., Huijbregts R.P.H., Pal H.C., Kuznetsova V., Davis M.D., Ong K.L., Fay C.X., Greene M.E., Overton E.T., Hel Z. Optimization of methods for the accurate characterization of whole blood neutrophils. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, 3667. doi: 10.1038/s41598-022-07455-2.
15. Degel J., Shokrani M. Validation of the efficacy of a practical method for neutrophils isolation from peripheral blood. *Clin. Lab. Sci.*, 2010, Vol. 23, pp. 94-98.
16. Ferrante A., Thong Y.H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods*, 1980, Vol. 36, no 2, pp. 109-117.
17. Ganesh K., Joshi M.B. Neutrophil sub-types in maintaining immune homeostasis during steady state, infections and sterile inflammation. *Inflamm. Res.*, 2023, Vol. 72, pp. 1175-1192.
18. Giudicelli J., Philip P.J.M., Delque P., Sudaka P. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods*, 1982, Vol. 54, pp. 43-46.
19. Handrigan M.T., Burns A.R., Donnachie E.M., Bowden R.A. Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration. *Shock*, 2005, Vol. 24, no. 5, pp. 434-439.
20. Hsu A.Y., Peng Z., Luo H., Loison F. Isolation of Human Neutrophils from Whole Blood and Buffy Coats. *J. Vis. Exp.*, 2021, Vol. 175, e62837. doi: 10.3791/62837.
21. Hundhammer T., Gruber M., Wittmann S. Paralytic impact of centrifugation on human neutrophils. *Biomedicine*, 2022, Vol. 10, no. 11, 2896. doi: 10.3390/biomedicine10112896.
22. Jackson M.H., Millar A.M., Dawes J., Bell D. Neutrophil activation during cell separation procedures. *Nucl. Med. Commun.*, 1989, Vol. 10, no. 12, pp. 901-904.
23. Kolářová H., Vítěček J., Černá A., Černík M., Přibyl J., Skládal P., Potěšil D., Ihnatová I., Zdráhal Z., Hampl A., Klinke A., Kubala L. Myeloperoxidase mediated alteration of endothelial function is dependent on its cationic charge. *Free Radic. Biol. Med.*, 2020, Vol. 162, pp. 14-26.
24. Krabbe J., Beilmann V., Alamzad-Krabbe H., Böll S., Seifert A., Ruske N., Kraus T., Martin C. Blood collection technique, anticoagulants and storing temperature have minor effects on the isolation of polymorphonuclear neutrophils. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 14646. doi: 10.1038/s41598-020-71500-1.
25. Kremer V., Godon O., Bruhns P., Jönsson F., de Chaisemartin L. Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1301183. doi: 10.3389/fimmu.2023.1301183.
26. Kremserova S., Nauseef W.M. Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol. Biol.*, 2020, Vol. 2087, pp. 33-42.
27. Kuhns D.B., Priel D.A.L., Chu J., Zarembek K.A. Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015, Vol. 111, pp. 7.23.1-7.23.16.
28. Liew P.X., Kubes P. The neutrophil's role during health and disease. *Physiol. Rev.*, 2019, Vol. 99, no. 2, pp. 1223-1248.
29. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 519-531.
30. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.*, 2014, Vol. 9, pp. 181-218.
31. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 7, pp. 1283-1299.
32. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, no. 3, pp. 173-182.
33. Nauseef W.M. Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunol. Rev.* 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 5-10.
34. Nauseef W., Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 602-611.
35. Oh H., Siano B., Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J. Vis. Exp.*, 2008, Vol. 17, 745. doi: 10.3791/745.
36. Quach A., Ferrante A. The application of dextran sedimentation as an initial step in neutrophil purification promotes their stimulation, due to the presence of monocytes. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 1254792. doi: 10.1155/2017/1254792.
37. Rahman A.H., Tordesillas L., Berin M.C. Heparin reduces nonspecific eosinophil staining artifacts in mass cytometry experiments. *Cytometry A*, 2016, Vol. 89, pp. 601-607.

38. Scapini P., Calzetti F., Cassatella M.A. On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Immunol. Methods*, 1999, Vol. 232, pp. 121-129.
39. Scapini P., Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S., Cassatella M.A. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur. J. Immunol.*, 2001, Vol. 31, pp. 1981-1988.
40. Scapini P., Nardelli B., Nadali G., Calzetti F., Pizzolo G., Montecucco C., Cassatella M.A. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional B220. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, pp. 297-302.
41. Selsted M.E., Harwig S.S., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R.I. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.*, 1985, Vol. 76, pp. 1436-1439.
42. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.*, 2010, Vol. 31, no. 8, pp. 318-324.
43. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon". *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, Suppl. 2, e12952. doi: 10.1111/eci.12952.
44. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1124, pp. 451-467.
45. Tamassia N., Zimmermann M., Castellucci M., Ostuni R., Bruderek K., Schilling B., Brandau S., Bazzoni F., Natoli G., Cassatella M.A. Cutting edge: an inactive chromatin configuration at the IL-10 locus in human neutrophils. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, pp. 1921-1925.
46. Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 508. doi: 10.3389/fimmu.2014.00508.
47. Thomas H.B., Moots R.J., Edwards S.W., Wright H.L. Whose gene is it anyway? The effect of preparation purity on neutrophil transcriptome studies. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138982. doi: 10.1371/journal.pone.0138982.
48. Trentini A., Murganti F., Rosta V., Cervellati C., Manfrinato M.C., Spadaro S., Dallochio F., Volta C.A., Bellini T. Hydroxyethyl Starch 130/0.4 Binds to neutrophils impairing their chemotaxis through a mac-1 dependent interaction. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 4, 817. doi: 10.3390/ijms20040817.
49. Watson F., Robinson J.J., Edwards S.W. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci. Rep.*, 1992, Vol. 12, no 2, pp. 123-133.
50. Zimmermann M., Aguilera F.B., Castellucci M., Rossato M., Costa S., Lunardi C., Ostuni R., Girolomoni G., Natoli G., Bazzoni F., Tamassia N., Cassatella M.A. Chromatin remodelling and autocrine TNFalpha are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 6061. doi: 10.1038/ncomms7061.

Авторы:

Швыдченко И.Н. — к.б.н., доцент кафедры физиологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма»; доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Быковская Е.Ю. — к.б.н., биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Голубцов В.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Shvydchenko I.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology, Kuban State University of Education, Sport and Tourism; Associate Professor, Department of Normal Physiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Bykovskaya E.Yu., PhD (Biology), Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Golubtsov V.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Anesthesiology, Reanimatology and Transfusiology, Faculty of Advanced Training and Teaching Staff, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 06.01.2024
Принята к печати 09.03.2024

Received 06.01.2024
Accepted 09.03.2024