

ОЦЕНКА НЕТОЗА МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Гусакова Н. В.¹, Ярец Ю. И.²

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Государственное учреждение

«Республиканский научно-практический центр

радиационной медицины и экологии человека»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время характер и тяжесть течения воспалительных процессов различного генеза рассматривают в разрезе нарушения баланса между пулом функционально активных и подвергнувшихся программированной клеточной гибели иммунокомпетентных клеток [1]. Учитывая это, задача обнаружения и количественной оценки различных типов программированной клеточной гибели, таких как нетоз, апоптоз, некроз и др., является одним из перспективных направлений клинической лабораторной диагностики.

Цель

Сравнительный анализ методов люминесцентной визуализации NET (neutrophil extracellular traps) с использованием красителя акридинового оранжевого и суправитального двойного флуорохромирования смесью акридинового оранжевого и этидиума бромидом.

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 получения нефракционированной лейкоцитарной суспензии верхний слой плазмы удаляли, нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку собирали в отдельную пробирку, доводили фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) до концентрации 5×10^6 нейтрофилов/мл, затем инкубировали 150 мин при 37 °С. Учет образовавшихся NET проводили двумя способами: путем окрашивания акридиновым оранжевым (100 мкг/мл) [2], и методом суправитального двойного флуорохромирования смесью акридинового оранжевого (100 мкг/мл) и этидиума бромидом (100 мкг/мл) [3] с последующей люминесцентной микроскопией ($\lambda_{\text{возбуждения}} 490 \text{ нм}$; $\lambda_{\text{эмиссии}} 520 \text{ нм}$; $\times 1000$). Уровень нетоза оценивали, подсчитывая не менее 200 нейтрофилов и выражали в процентном соотношении.

Статистический анализ осуществлялся на основании непараметрических методов, результаты выражались в виде Me (25; 75 %), где Me — медиана, 25 % — нижний квартиль, 75 % — верхний. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами была проведена оценка уровня нетоза здоровых лиц ($n = 12$) методом люминесцентной микроскопии. Для этого из клеточного осадка готовили 2 мазка, один из которых фиксировали 96° этанолом и окрашивали акридиновым оранжевым, а второй, не фиксируя, окрашивали смесью акридинового оранжевого с этидиумом бромидом. Сопоставление количества NET, обнаруженных при различных способах окраски, показало отсутствие значимых различий (W-критерий Вилкоксона). При этом количество NET составило 5 % (5; 6) и 5 % (4; 6) при окраске акридиновым оранжевым и методом двойного флуорохромирования смесью акридинового оранжевого и этидиума бромидом соответственно.

Известно, что плазматическая мембрана живых, апоптотических и некротических клеток имеет разную степень проницаемости для флуоресцирующих витальных красителей. Так, ДНК-тропные красители с высокой молекулярной массой, такие как пропидия йодид, этидия бромид и др., не проникают в живые, но свободно проникают в некротические клетки. Мембрана апоптотических клеток слабо проницаема для таких красителей. В то же время, акридиновый оранжевый хорошо проникает через мембраны живых клеток, однако не позволяет

дифференцировать апоптотические и некротические нейтрофилы [4]. Предлагаемый нами способ с использованием смеси витальных флуоресцентных красителей (акридинового оранжевого и этидиума бромид) значительно повышает информативность исследования, т.к. позволяет не только оценивать нетоз, но и четко дифференцировать уровень апоптотических, некротических и жизнеспособных нейтрофилов. При этом NET представлены тонкими свободнолежащими внеклеточно расположенными фибриллярными структурами красно-оранжевого цвета; ядра апоптотически измененных нейтрофилов характеризуются конденсацией хроматина в виде ярких, плотных, однородно окрашенных сфер или полумесяцев, имеющих зеленое свечение; жизнеспособные нейтрофилы представляют собой клетки, ядро которых имеет рыхлую, неоднородную структуру и бледно-зеленую флуоресценцию; маргинация хроматина в виде глыбок красно-оранжевого цвета, вследствие накопления этидиума бромида, является специфическим признаком некроза нейтрофилов.

Заключение

Для оценки уровня нетоза может быть использован метод суправитального двойного флуорохромирования смесью акридинового оранжевого и этидиума бромида, позволяющий четко дифференцировать не только NET, но и количество апоптотических, некротических и жизнеспособных нейтрофилов, что значительно повышает информативность исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Потапнев, М. П.* Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого / М. П. Потапнев // Иммунология. — 2014. — № 2. — С. 95–102.
2. *Долгушин, И. И.* Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // Вестник РАМН. — 2010. — № 4. — С. 26–30.
3. *Gendoroglo, M.* Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia / M. Gendoroglo, B. Jaber // The J. Am. Soc. Nephrol. — 1999. — № 10. — P. 93–100.
4. *Ткач, А. В.* Методы обнаружения и количественной оценки апоптоза / А. В. Ткач, Л. А. Иванова, Ю. В. Стаценко // Медицина труда и промышленная экология. — 2008. — № 12. — С. 28–35.

УДК 612.821.44:616-099]-092.9

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ СИСТЕМЫ СРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ПРЕРЫВИСТОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Гуца В. К., Лелевич С. В.

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Введение

Проблема алкоголизма достаточно остро стоит перед современным обществом. Необходимо отметить, что злоупотребление этанолом уже давно представляет собой не только сугубо медицинскую проблему, но и существенно влияет на многие социальные аспекты жизни.

Нарушения функционального состояния нейромедиаторных систем головного мозга играют ключевую роль в формировании признаков алкогольной интоксикации и развитии синдрома зависимости. В ряде работ отмечается, что длительная алкоголизация приводит к дисфункции дофаминовой нейротрансмиттерной системы головного мозга и дефициту катехоламинов, который может принимать угрожающий характер [1]. Хроническое потребление алкоголя приводит к ослаблению ГАМК-ергической передачи и снижению общей активности данной системы [2]. Имеются данные, указывающие на важную роль нейромедиаторных нарушений центральной серотонинергической системы в патогенезе алкогольной зависимости [3].

Одним из наиболее часто встречающихся вариантов потребления алкоголя является его прерывистый прием, который представляет собой чередование более или менее длительных периодов алкогольной интоксикации с последующим прекращением его потребления (состояние отмены). Прерывистую алкогольную интоксикацию (ПАИ) можно рассматривать в качестве нового экспериментального варианта алкогольной болезни [4].