

**МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ
НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ**

Гусакова Н. В.

**Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь**

Введение

Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (neutrophil extracellular traps, NET) – это внеклеточные сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов, секретируемые нейтрофилами в ответ на микробные (*S. aureus*, *E. coli*, *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *S. flexneri*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *B. anthracis*) и немикробные стимулы (липополисахарид, форболмиристилацетат, тромбоцитарные TLR4, ИЛ-8) [5]. Методом конфокальной иммуофлюоресцентной цитохимии установлено, что в состав NET входят ДНК, белки-гистоны и гидролитические ферменты (миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза, протеиназа 3, катепсин G, лактоферрин, желатиназа и др.), обладающие бактерицидными свойствами [3, 5].

Ключевым процессом, запускающим формирование NET, считается активация NADPH — оксидазы, которая, в свою очередь, способствует выделению из азурофильных гранул нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, приводящих к повреждению ядерных гистонов и деконденсации хроматина. В дальнейшем ядерная мембрана распадается и клетка быстро выбрасывает высокоактивную смесь наружу, образуя своеобразную сеть, в которую, в последующем, попадают бактерии [3].

Образование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей является активным процессом, а не следствием разрушения клетки под влиянием стимуляторов, что доказано рядом исследований [4, 5]. Во-первых, в составе NET отсутствует цитоплазматический маркер нейтрофилов — лактатдегидрогеназа. Во-вторых, предварительная инкубация нейтрофильных гранулоцитов с интеркалирующими красителями перед началом активации этих клеток препятствует образованию NET, но не влияет на стимуляцию апоптоза индукторами каспаз или TNF α .

Формирование NET, как одного из механизмов реализации внеклеточной бактерицидности нейтрофилов, начинает проявляться после 2-х часовой инкубации с различными индукторами [4], тогда как *in vitro* показано, что в течение первых 60 мин фагоцитоз является основным механизмом по устранению патогенов. Это дает основание предполагать, что в условиях организма формирование NET обеспечивает киллинг микробов в случае неэффективного фагоцитоза.

Преимуществами NET, как механизма бактерицидности, является создание дополнительного физического барьера, препятствующего распространению патогенов (особенно являющихся слишком крупными для фагоцитоза), а также обеспечение высокой местной концентрации антимикробных продуктов нейтрофилов при минимальном повреждении окружающих тканей [3]. Предполагается важнейшая роль NET при поражениях возбудителями, которые не могут быть элиминированы путем фагоцитоза (протозойные патогены) [5]. Показана высокая бактерицидная активность NET при стрептококковых инфекциях мягких тканей, пневмококковой пневмонии, экспериментальной дизентерии [3].

Установлено, что нарушение процессов формирования нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей может играть существенную роль в патогенезе различных заболеваний. Так, увеличение NET при системных заболеваниях соединительной ткани с явлениями васкулита может служить дополнительным источником аутоантигенов и являет-

ся прогностически неблагоприятным [4]. Описаны врожденные дефекты образования NET при хронической гранулематозной болезни из-за мутации в NADPH-оксидазе [5].

Визуализация NET впервые была произведена с помощью сканирующей электронной микроскопии [3]. Однако необходимость специального оборудования, особые требования к приготовлению реактивов и препаратов делают этот метод малоприменимым для широкого практического использования. Описана возможность наблюдения NET в мазках крови, окрашенных на нуклеиновые кислоты по Фельгену [4] с предварительной дополнительной фиксацией клеток на стекле по методу Лилли в 10 %-ном забуференном формалине. Учет результатов при таком способе подготовки препаратов представляет определенные сложности: при световой микроскопии не всегда удается рассмотреть тонкие, внеклеточно расположенные волокна ДНК активированных нейтрофилов. Наиболее доступным для практических целей является экспресс-метод, предложенный И. И. Долгушиным и соавт. (2008), основанный на использовании флуоресцентного красителя акридинового оранжевого, избирательно связывающегося с нуклеиновыми кислотами [1]. Вместе с тем, применение люминесцентной микроскопии также имеет определенные ограничения: флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый обладает высокой канцерогенной активностью, низкой светостойкостью, не позволяющей длительно хранить окрашенные препараты. Поэтому вопрос об оптимизации способов визуализации NET для обеспечения возможности применения в рутинной лабораторной практике остается открытым.

Цель: исследование возможности использования окраски по Романовскому-Гимзе для оценки образования NET.

Методы исследования

Материалом для исследования служили лейкоциты периферической венозной крови 27 практически здоровых лиц в возрасте 19–45 лет. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной крови (10 Ед / мл) в течение 45 минут при 37 °С, отбирали нижний слой плазмы с лейкоцитарной пленкой, количество нейтрофилов в суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток / мл путем разведения необходимым количеством 0,9 %-ным раствором NaCl. Жизнеспособность клеток по тесту исключения трипанового синего составляла не менее 95 %.

Взвесь лейкоцитов центрифугировали 5 минут при 250 g, из осадка готовили мазки, высушивали, фиксировали 96° этиловым спиртом. Для визуализации NET применяли два подхода: окраску препаратов 0,04 %-ным водным раствором акридинового оранжевого по методике И. И. Долгушина [1] и по Романовскому-Гимзе [2]. Индикацию образовавшихся структур проводили с помощью иммерсионной люминесцентной (фильтр возбуждения — 490 нм, фильтр эмиссии — 520 нм) и световой микроскопии, учитывая четко дифференцируемые NET, сосчитанные на 200 нейтрофилов.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрического W-критерия Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 %; 75 %).

Результаты и их обсуждение

При окраске мазков акридиновым оранжевым NET были представлены тонкими ярко-зелеными внеклеточно расположенными волокнами, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила, при этом количество NET составило 5 % (5; 7).

При микроскопии препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе, мы наблюдали образования в виде тонких свободнолежащих нитей, окрашивающихся в сине-фиолетовый цвет за счет щелочного компонента красителя (азур II), которые расценивали как NET. Содержание таких структур составило 5 % (4; 7). Сравнительный анализ количества экстра-

целлюлярных сетей нейтрофилов, при применении выбранных нами способов окраски, методом парных сравнений с использованием непараметрического W-критерия Вилкоксона показал отсутствие между ними значимых различий. Кроме того, в отдельных препаратах, окрашенных акридиновым оранжевым, мы фиксировали координаты подсчитываемых NET, а затем производили докраску по Романовскому-Гимзе с последующей микроскопией. При этом образования, идентифицируемые как с помощью люминесцентной, так и световой микроскопии, имели сходные морфологические признаки и были представлены тонкими свободнележащими внеклеточно расположенными фибриллярными структурами.

Заключение

Проведенные исследования показали, что для индикации NET может быть использован метод окрашивания препаратов по Романовскому-Гимзе, являющийся относительно простым и позволяющий не только определить наличие экстрацеллюлярных сетей, но и количественно охарактеризовать данное явление, так как хорошо различима морфология образовавшихся структур.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Селиванов, Е. В. Красители в биологии и медицине / Е. В. Селиванов. — Барнаул: 2003. — 44 с.
3. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann // Science. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535.
4. Fuchs, T. A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T. A. Fuchs // The Journal of Cell Biology. — 2007. — Vol. 176. — P. 231–241.
5. Zychlinsky, A. NETs: a new strategy for using old weapons / A. Zychlinsky // Trends in Immunology. — 2009. — Vol. 30, № 11. — P. 513–521.

УДК 617.753.2-053.5

ШКОЛЬНАЯ БЛИЗОРУКОСТЬ

Дегтярева Е. И., Сарасеко Е. Г.

Учреждение образования

**«Мозырский государственный педагогический университет им. И. П. Шамякина»
г. Мозырь, Республика Беларусь**

Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие

**«Институт радиологии»
г. Гомель, Республика Беларусь**

Введение

Зрение принадлежит к числу интереснейших явлений природы. Оно дает людям 90 % информации, воспринимаемой из внешнего мира. Хорошее зрение необходимо человеку для работы, учебы, отдыха. Чрезмерные информационные нагрузки приводят к серьезным нарушениям и заболеваниям органа зрения. В развитых странах каждый четвертый человек — близорукий [5].

Близорукость (миопия) — один из видов аномалий рефракции глаза, при котором параллельные лучи света, попадающие в глаз, после преломления сходятся в фокусе не на сетчатке, а впереди нее [1].

Чаще всего изображение удаленных предметов не достигает сетчатки по двум причинам:

— в случае неправильной (удлиненной) формы глазного яблока;

— если оптическая система глаза преломляет лучи слишком сильно.

Иногда случается и комбинированный вариант: сочетание обоих дефектов глазного яблока у одного человека [3].

Близорукость — нарушение зрения, при котором человек хорошо видит предметы, расположенные на близком расстоянии, и плохо — предметы, удаленные от него. Обычно болезнь начинает развиваться в возрасте от 7 до 15 лет, а затем либо усугубляется, либо сохраняется на прежнем уровне.