

УДК 616.24-002.1:616.155.34

ОБРАЗОВАНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Малолетникова И. М.

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

Введение

Нейтрофилы — это один из факторов врожденного иммунитета, участвующий в инфекционном процессе, составляющий первую линию защиты от инфекции и обеспечивающий основной уровень иммунитета в ответ на проникновение патогенов. Описан новый механизм антимикробного действия нейтрофилов. В ходе исследований, выяснилось, что после активации нейтрофильные гранулоциты выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры. Эти структуры состоят из ДНК, гистонов, различных белков, ферментных гранул, таких как эластаза и миелопероксидаза. Структуры были названы как «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (Neutrophil Extracellular Traps или НВЛ) [1]. Neutrophil Extracellular Traps изолируют и уничтожают грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибковые патогены, вирусы. В 2007 г. В. Е. Steinberg и S. Grinstein ввели термин «NETosis» для обозначения гибели нейтрофилов, которая приводит к образованию NETs. Показано, что NETosis морфологически значительно отличается от апоптоза и других форм гибели клеток. Ловушки образуются при участии различных внешних факторов и сигналов, а также микробной стимуляции. Способствуют формированию ловушек такие провоспалительные агенты как: интерлейкин-8, липополисахарид (ЛПС) или форболмиристатацетат [1].

Цель

Оценить образование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови у пациентов с острой пневмонией.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находилось 42 пациента (20 девочек и 22 мальчика) в возрасте 11,5 (8,0; 13,5) лет, поступивших на стационарное лечение с диагнозом острая пневмония в инфекционное отделение Учреждение «Гомельская областная детская клиническая больница». В исследование были включены только пациенты с рентгенологически подтвержденной пневмонией.

Группа сравнения состояла из 30 человек, сопоставимых по полу, возрасту и не имеющей острой патологии.

Помимо стандартной схемы обследования всем пациентам проведена оценка нетоза (в спонтанном (NET_{сп}) и стимулированном (NET_{ст}) вариантах с расчетом индекса функционального резерва по формуле: $ФР_{NET} = (NET_{ст} - NET_{сп})/NET_{ст}$), при этом исследование проведено в остром периоде заболевания по методу И. И. Долгушина (2010) в модификации [2, 3].

Материалом для исследования служили лейкоцитарная взвесь. Для получения лейкоцитарной взвеси забирали 5–6 мл венозной крови с гепарином. Кровь отстаивали при 37 °С в течение 30 мин под углом 45°, затем в вертикальном положении 15 мин при комнатной температуре. Плазму, обогащенную мононуклеарами, удаляли, далее оставшиеся клетки центрифугировали 10 мин при 1000 оборотов в минуту и собирали образовавшуюся пленку, содержащую нейтрофильные лейкоциты.

Интенсивность процессов оценивали после того, как к 0,1 мл суспензии нейтрофилов в концентрации 5×10^9 клеток/л добавляли 10 мкл микробной взвеси бактерии *S. aureus* в

концентрации 1×10^8 бактериальных клеток в 1 мл. Инкубировали смесь в течение 180 мин при температуре 37 °С. Контрольные пробы инкубировали в тех же условиях, но без микроорганизмов. Через 180 мин инкубации из реакционной смеси забирали 20 мкл содержимого и готовили мазки. После высушивания мазки фиксировали 96° этанолом, окрашивали по Романовскому и подсчитывали под иммерсионным увеличением количество внеклеточных ловушек на 200 сосчитанных нейтрофилов или мазки окрашивали 0,04 % водным раствором акридинового оранжевого в течение 2 мин в темноте, контролем служили клетки, инкубируемые в тех же условиях без стимулятора. Учет проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Optika XDS-3FL4 (увеличение $\times 1000$, фильтр возбуждения — 490 нм, фильтр эмиссии — 520 нм). Ядра нейтрофилов флуоресцировали ярко-зеленым цветом, нейтрофильные ловушки были представлены тонкими свободнолежащими ярко-зелеными нитями, занимающими пространство, в 2–3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети, сосчитанные на 200 нейтрофилов, результат выражали в процентах [4, 5].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ «Statistica» 10.0. Результаты представлены как медиана и интерквартильный размах (25 %; 75 %). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведен сравнительный анализ уровня нетоза ($NET_{сп}$, $NET_{ст}$), а также $ФР_{NET}$ в остром периоде пневмонии двумя способами: первый способ при окрашивании препаратов крови 0,04 % водным раствором акридинового оранжевого с последующей флуоресцентной микроскопией (микроскопа Optika XDS-3FL4, увеличение $\times 1000$, фильтр возбуждения — 490 нм, фильтр эмиссии — 520 нм); второй способ при окрашивании препаратов крови по Романовскому с последующей световой микроскопией (увеличение $\times 1000$), результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели нетоза у пациентов в остром периоде с острой внегоспитальной пневмонией Me (25; 75)

Показатель	Группа сравнения (n = 30) 1	Флуоресцентная микроскопия (n = 42) 2	Световая микроскопия (n = 42) 3	Уровень статистической значимости, (U; p)	
$NET_{сп}$, %	5,0 (4,0; 7,0)	9,0 (6,0; 12,0)	10,0 (5,0; 8,0)	U = 20; $p_{1-2} = 0,0003$	U = 39; $p_{1-3} = 0,0025$
$NET_{ст}$, %	11,0 (9,0; 13,0)	16,0 (9,0; 18,0)	14,0 (8,0; 16,0)	U = 34; $p_{1-2} = 0,0001$	U = 55; $p_{1-3} = 0,015$
$ФР_{NET}$, ед.	0,5 (0,4; 0,6)	0,4 (0,4; 0,5)	0,4 (0,3; 0,5)	U = 74; $p_{1-2} = 0,031$	U = 114; $p_{1-3} = 0,045$
		$U_{NET_{сп}} = 89$; $p_{2-3} = 0,12$ $U_{NET_{ст}} = 90$; $p_{2-3} = 0,24$ $U_{ФР_{NET}} = 64$; $p_{2-3} = 0,56$			

Как видно из данных таблицы 1, отмечалось повышение способности к образованию экстрацеллюлярных сетей у пациентов в остром периоде пневмонии, как в спонтанном тесте ($NET_{сп}$), так и в стимулированном ($NET_{ст}$), однако резерв NET-образующей активности снижался, по сопоставлению с группой сравнения. При сравнении уровня нетоза, определенного двумя методами (флуоресцентной и световой микроскопии) различий не наблюдалось. NET-образующие свойства нейтрофилов рассматривают в настоящее время как механизм реализации внеклеточной бактерицидности, эффективно обезвреживающий бактерии в условиях незавершенного фагоцитоза и действующий на более поздних этапах после контакта фагоцитов с антигеном (через 3–4 ч).

Возможно, повышение нетоза, выявленное нами у пациентов в остром периоде пневмонии может быть одной из причин персистенции возбудителя и снижение эффективности антибактериальной терапии данной патологии, следовательно, отражает компенсаторно-адаптационную реакцию организма на недостаточность внутриклеточных факторов бактерицидности. Для подтверждения данного предположения необходимы дальнейшие комплексные исследования поглотительной и метаболической активности нейтрофилов.

Выводы

Таким образом, формирование экстрацеллюлярных сетей у пациентов в остром периоде пневмонии является одним из проявления функциональных свойств нейтрофильных гранулоцитов, расширяющих их бактерицидный потенциал.

Метод визуализации NET путем окрашивания препаратов по Романовскому обладает хорошей воспроизводимостью результатов, позволяет значительно снизить трудоемкость исследования, не требует дорогостоящего оборудования и расходных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малолетникова, И. М. Особенности патогенеза, роль окислительного стресса, антиоксидантной системы и функционального статуса нейтрофилов у детей с внегоспитальной пневмонией / И. М. Малолетникова // Проблемы здоровья и экологии. — 2018. — № 2 (56). — С. 10–15.
2. Долгушин, И. И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина. — М.: Изд-во РАМН, 2009. — 208 с.
3. Петренко, Т. С. Методологические подходы к оценке хемилюминесценции плазмы крови / Т. С. Петренко, И. А. Новикова А. В. Гомоляко // Чернобыльские чтения – 2012: матер. междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 19–20 апр. 2012 г. / Респ. науч.-практ. центр радиационной медицины и экологии человека; под общ. ред. А. В. Рожко. — Гомель: РНПЦ РМиЭЧ, 2012. — С. 214–217.
4. Гусакова, Н. В. Методы обнаружения нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей / Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 16–17 февр. 2012 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызикив [и др.]. — Гомель: ГомГМУ, 2012. — Т. 1. — С. 181–183.
5. Гусакова, Н. В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: биологическая роль, методы определения / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Лабораторная диагностика Восточная Европа. — 2014. — Т. 9, № 1. — С. 96–104.

УДК 616-002.17-002.191-056.7-07-053.2

ТРУДНОСТИ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА У ДЕТЕЙ (СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ)

Моторенко Н. В., Зарянкина А. И., Чеченкова Е. В.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Муковисцидоз — наследственное заболевание, которое передается по аутосомно-рецессивному типу и обусловлено мутацией гена расположенного в длинном плече 7-й хромосомы. В настоящее время известно более 2000 мутаций гена муковисцидоза. Наиболее часто встречаемая и тяжелая мутация гена DF 508. В результате мутации происходит нарушение синтеза и функции белка трансмембранного регулятора муковисцидоза (МВТР). Хлорные каналы становятся непроницаемы для ионов хлора при гиперабсорбции натрия и одновременном поступлении воды в клетку, это приводит к дегидратации апикальной поверхности секреторного эпителия и увеличению вязкости слизи. Как итог, происходит затруднение эвакуации секрета экзокринных желез и формирование фиброза в пораженных органах. Белок МВТР находится в каждом органе человека, который выделяет слизь, включая легкие, печень, поджелудочную железу и кишечник, а также потовые и слюнные железы. В настоящее время белок МВТР обнаружен в клетках иммунной системы и сердца [1].

Различают следующие формы муковисцидоза: легочная, кишечная, смешанная, мекониальный илеус, атипичные формы.