

Из данных таблицы 1 видно, что у пациентов с ИТП параметры кислород-продуцирующей активности НГ (как в спонтанном, так и в стимулированном НСТ-тестах) не изменялись по сравнению со здоровыми лицами. Также не наблюдалось изменения поглотительной активности НГ (показатели ФИ, ФЧ).

В то же время отмечалось увеличение количества внеклеточных ловушек в 8 раз в спонтанном (NET сп) и в 3,6 раза в стимулированном *S. aureus* (NET ст) вариантах тестов относительно контрольной группы ($p = 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно). При этом взаимосвязи между процессами кислородпродуцирующей активности НГ и их способностью к формированию NET не было обнаружено.

Нейтрофильные внеклеточные ловушки являются одним из способов реализации нейтрофилами бактерицидного потенциала. По данным различных исследований известно, что количество сетей повышается при ряде патологий как инфекционной так и неинфекционной природы [4, 5]. Описанное нами значительное увеличение количества NET в сравнении со здоровыми лицами может быть связано с наличием в крови пациентов с ИТП веществ, стимулирующих процесс высвобождения нейтрофильных ловушек. Возможно, непосредственно сетеподобные структуры могут выступать дополнительными факторами агрессии, вызывая окклюзию мелких сосудов, что в свою очередь может приводить к усугублению патологических процессов в системе микроциркуляции при ИТП.

Выводы

1. У пациентов с ИТП поглотительная (фагоцитоз *S. aureus*) и кислородпродуцирующая (НСТ-тест) активность нейтрофилов крови не изменена.
2. Выявлено значительное усиление спонтанной и стимулированной (NETсп, NETст) способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек у пациентов с ИТП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cooper, N. The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura / N. Cooper, J. Bussel // British Journal of Haematology. — 2006. — Vol. 133. — P. 364–374.
2. Human Blood Platelets, PMN Leukocytes and Their Interactions *in vitro*. Responses to Selective and Non-selective Stimuli / K. Drábiková [et al.] // Gen. Physiol. Biophys. — 2000. — Vol. 19. — P. 393–404.
3. Железко, В. В. Способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек в различных модельных системах / В. В. Железко, О. Ю. Слышова // Материалы Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины — 2014», Гомель, 23–24 апреля 2014 г. / Гомельский гос.мед. университет; редкол.: А. Н. Лызикив [и др.]. — Гомель, 2014. — Т. 1. — С. 142–143.
4. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury / A. Caudrillier [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. — 2012. — Vol. 122. — P. 2661–2671.
5. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood / S. R. Clark [et al.] // Nature medicine. — 2007. — Vol. 13. — P. 463–469.

УДК 612.111.7:612.112.91]:616-071/-074

МЕТОД ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛАМИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ

Зубкова Ж. В.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время активно изучаются аспекты взаимодействия лейкоцитов с тромбоцитами. Известны методы исследования влияния тромбоцитов на функции нейтрофилов, в том числе на их способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NET), в культурах *in vitro* с люминесцентной микроскопией, а также в экспериментальных моделях на животных [1]. Однако эти методы не доступны большинству клинических лабораторий в силу своей сложности, трудоемкости и необходимости дорогостоящего оборудования. Разработка более приемлемых методических подходов к изучению влияния тромбоцитов на способность нейтрофилов к формированию NET расширит возможности их исследования.

Цель

Одобрать оптимальные условия оценки влияния тромбоцитов на способность нейтрофилов к формированию NET в модельной системе *in vitro*.

Материал и методы исследования

Объектом исследования явились лейкоциты 27 практически здоровых лиц, которые получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови (10 Ед/мл) в течение 45 мин. при 37 °С. Количество нейтрофильных гранулоцитов в суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4).

Образование NET лейкоцитами исследовались по методу И. И. Долгушина и соавт. в нашей модификации [2, 4]. Подготовленные лейкоциты смешивали в равных объемах с питательной средой RPMI-1640 или с каким-либо индуктором: инактивированным нагреванием *S. aureus* (10^8 КОЕ/мл, контроль по стандарту мутности шкалы McFarland), обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП) с концентрацией тромбоцитов 200×10^9 ; 200×10^7 ; 200×10^5 ; 200×10^3 кл/л и безтромбоцитарной плазмой (БТП). Пробы инкубировали в течение 30 и 150 мин. при 37 °С, изготавливали мазки, окрашивали по Романовскому — Гимзе и микроскопировали. Подсчет NET осуществляли в мазках на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Обработку результатов проводили с использованием непараметрических методов. Результат выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (25,75 %). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для характеристики NET-образующей способности нейтрофилов в большинстве исследований рекомендованная длительность культивирования клеток составляет 150 мин., в связи с тем, что такая продолжительность инкубации оптимальна для выхода из азурофильных гранул и перемещения к ядру клетки нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, приводящих к изменениям внутри клетки, и в конечном итоге — к экстррузии нейтрофильных внеклеточных ловушек [4]. Однако, по данным ряда авторов тромбоцит — зависимое образование NET происходит за более короткий промежуток времени и занимает несколько минут [3]. Поэтому, для оценки влияния тромбоцитов на формирование NET в нашей системе использовали инкубацию клеточной смеси в течение 30 и 150 мин.

В таблице 1 представлены результаты исследования способности нейтрофилов к формированию NET в различных условиях инкубации.

Таблица 1 — Формирование NET нейтрофилами здоровых лиц в зависимости от длительности и условий культивирования (n = 27)

Тест-система	Длительность инкубации	
	30 минут	150 минут
Лейкоциты + питательная среда	3,0 (2,0; 5,0)	6,0 (4,0; 7,0)**
Лейкоциты + инактивированный <i>S. aureus</i>	5,0 (4,0; 8,0)*	11,0 (8,0; 15,0)*/**
Лейкоциты + ОТП (200×10^9 кл/л)	1,0 (1,0; 2,0)*	3,0 (2,0; 6,0)**
Лейкоциты + БТП	2,5 (2,0; 5,0)	3,0 (2,0; 6,0)

Примечание: Данные представлены в виде Me (25 %; 75 %); * различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с уровнем NET в присутствии питательной среды; ** различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с временем инкубации 30 мин.

Как видно из таблицы 1, в культуре лейкоцитов, инкубированных со *S. aureus* в течение 30 мин. образование сетей повышалось относительно инкубации в среде без индуктора ($p = 0,03$). В то же время добавление к лейкоцитам вместо среды ОТП, но не БТП, подавляло образование NET ($p = 0,04$).

При культивировании в течение 150 мин., добавление к лейкоцитам *S. aureus* давало такой же эффект, как при инкубации 30 мин., то есть наблюдалось увеличение количества NET в присутствии *S. aureus* относительно NET в культуре со средой ($p = 0,03$). В то же время инкубация лейкоцитов с добавлением бедной и богатой тромбоцитами плазмы не приводила к значимому изменению количества NET.

Сравнение показателей за 30 и 150 мин. инкубации позволило установить, что при более длительном культивировании образование NET повышается как в культурах с добавлением питательной среды ($p = 0,03$), так и в присутствии *S. aureus* и ОТП ($p = 0,02$, $p = 0,04$ соответственно). Количество NET в присутствии БТП в те же сроки не изменялось.

Это свидетельствует, что угнетающее действие тромбоцитов на NET-образующую функцию нейтрофилов проявляется только при времени инкубации 30 мин.

Результат оценки влияния концентрации тромбоцитов в смешанной культуре с лейкоцитами на образование NET представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Влияние концентрации тромбоцитов в культурах на образование NET нейтрофилами

Тест-система	Показатели NET-образующей способности нейтрофилов
Лейкоциты + ОТП (200×10^9 кл/л)	2,0 (1,0; 3,0)*
Лейкоциты + ОТП (200×10^7 кл/л)	2,0 (2,0; 3,0)*
Лейкоциты + ОТП (200×10^5 кл/л)	4,0 (3,0; 5,0)
Лейкоциты + ОТП (200×10^3 кл/л)	4,0 (2,0; 6,0)
Лейкоциты + питательная среда (контроль)	3,0 (2,0; 5,0)

* Различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении контролем; данные представлены в виде Me (25%; 75%).

Как видно из таблицы 2, способность нейтрофилов к образованию сетей снижалась только в присутствии тромбоцитов в количестве 200×10^9 и 200×10^7 кл/л относительно контроля ($p = 0,03$, $p = 0,02$ соответственно). При более низкой концентрации клеток NET-образующие свойства нейтрофилов не изменялись. Это свидетельствует, что минимальная достаточная концентрация тромбоцитов для исследования их влияния на NET-образующие свойства нейтрофилов в краткосрочной культуре *in vitro* составляет 200×10^7 кл/л.

Выводы

1. Для оценки влияния тромбоцитов на NET-образующие свойства нейтрофилов можно использовать краткосрочное (30 мин.) совместное культивирование тромбоцитов (концентрация не менее 200×10^7 кл/л) и лейкоцитов крови (концентрация 5×10^6 кл/мл).

2. Угнетающее действие тромбоцитов на NET-образующие свойства нейтрофилов должно учитываться при исследовании функциональных свойств нейтрофилов в клинико-диагностической лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА

1. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury / A. Cadrillier [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. — 2012. — Vol. 122. — № 7. — P. 2661–2671.
2. Долгушин, И. И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. — 2009. — Т. 10, № 3. — С. 458–462.
3. Role of neutrophil extracellular traps following injury / F. Liu [et al.] // SHOCK. — 2014. — Vol. 41. — № 6. — P. 491–498.
4. Железко, В. В. Способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек в различных модельных системах / В. В. Железко, О. Ю. Слышова: Сб. науч. ст. Республиканская научно-практической конференция с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины — 2014» / Гомельский гос. мед. университет; ред. кол.: А. Н. Лызиков [и др.]. — Гомель, 2014. — Т. 2. — С. 15–17.

УДК 616-002.5-053.2

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ТУБЕРКУЛИНУ И АЛЛЕРГЕНУ ТУБЕРКУЛЕЗНОМУ РЕКОМБИНАНТНОМУ У ДЕТЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Зуевич А. С.

Научный руководитель: ассистент кафедры Ж. Е. Сверж

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Туберкулез — это хроническое инфекционное заболевание. Наиболее часто человек встречается с туберкулезной инфекцией в детском возрасте, преимущественно от 3–16 лет. Результатом контакта человека и микобактерий туберкулеза могут быть следующие из со-