

УДК 616.155.34

УРОВЕНЬ НЕТОЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ© Гусакова Н.В.¹, Гомоляко А.В.², Железко В.В.¹¹Гомельский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 246000, Гомель, ул. Ланге, 5²Государственный комитет судебных экспертиз, Республика Беларусь, 220073, Минск,

ул. Кальварийская, 43

Резюме

Цель. Сравнительный анализ уровня нетоза нейтрофилов, полученных из нефракционированной лейкоцитарной суспензии, и выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколла-верографина на примере здоровых лиц и пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом.

Методика. Объектом исследования были нейтрофильные гранулоциты периферической венозной крови 30 практически здоровых человек и 36 пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом тяжелого течения в стадии ремиссии. Нефракционированную лейкоцитарную суспензию получали путем отстаивания, концентрацию нейтрофилов доводили фосфатно-солевым буфером (рН=7,4) до 5×10^6 клеток/мл. Для выделения чистых клеточных культур нейтрофильных гранулоцитов использовали двойной градиент плотности фиколла-верографина, при этом плотность верхнего слоя градиента составляла $1,077 \text{ г/см}^3$, нижнего – $1,119 \text{ г/см}^3$. Оценивали образование NET в культурах лейкоцитов, инкубируемых в течение 150 мин. без (спонтанный уровень; NETсп) и с растворимыми продуктами *S. aureus* (стимулированный уровень; NETст). Далее суспензию наносили на предметное стекло, окрашивали по Романовскому-Гимзе и микроскопировали с использованием иммерсионного увеличения ($\times 1000$), считали процентное содержание NET при просмотре 200 нейтрофилов.

Результаты. Проведенный нами сравнительный анализ нетоза клеток, полученных из лейкоконцентрата, показал, что как у здоровых лиц, так и у пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом, отмечалось значимое повышение стимулированного уровня NET-образующей способности нейтрофилов относительно спонтанного ($p < 0,001$). Уровень спонтанного нетоза нейтрофильных гранулоцитов, выделенных путем градиентного центрифугирования, не отличался от значений нетоза при стимуляции, и при этом был значимо выше показателя NETсп клеток, полученных из нефракционированной лейкоцитарной взвеси ($p < 0,001$).

Заключение. Для изучения показателей нетоза *in vitro* рекомендуется использование нефракционированной лейкоцитарной суспензии, полученной путем отстаивания и стандартизированной по количеству нейтрофилов (5×10^6 клеток/мл).

Ключевые слова: нетоз, лейкоцитарная суспензия, нейтрофил

NETOSIS LEVEL DEPENDING ON THE NEUTROPHILS ISOLATION METHOD

Gusakova N.V.¹, Gomolyako A.V.², Zhelezko V.V.¹¹Gomel State Medical University, 5, Lange St., 246000, Gomel, Republic of Belarus²State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, 43, Kal'varijskaja St., 220073, Minsk, Republic of Belarus*Abstract*

Objective. A comparative analysis of NETosis in neutrophils, obtained from the unfractionated leukocyte suspension, and neutrophils, isolated from peripheral blood on the ficoll density gradient, on the example of healthy individuals and patients with chronic recurrent furunculosis was carried out.

Methods. The objects of the study were peripheral blood neutrophils of 30 healthy volunteers and 36 patients with chronic recurrent furunculosis in the remission period. The unfractionated leukocyte suspension was obtained by settling; cell suspensions were standardized by phosphate buffered saline till 5×10^6 neutrophils/ml. To isolate pure cell cultures of neutrophils the double ficoll density gradient centrifugation was used, in which the density of the upper gradient layer was 1.077 g/cm^3 , the lower one – 1.119 g/cm^3 . NET formation was measured in leukocyte cultures, incubated for 150 minutes without (unstimulated NETosis level) or in presence of soluble *S. aureus* products (stimulated NETosis level).

The suspension was then applied to a slide, dyed by Giemsa and microscopized using immersion ($\times 1000$), and the percentage of NET for 200 neutrophils was counted.

Results. Our comparative analysis of the NETosis of cells obtained from leukocyte suspension showed that both healthy individuals and patients with chronic recurrent furunculosis had a significant increase of stimulated NETosis level relatively to the unstimulated condition ($p < 0.001$). Unstimulated NETosis level in neutrophils, obtained by gradient centrifugation, did not differ from the values of NETosis during stimulation, and at the same time was significantly higher than the unstimulated NETosis level of cells, obtained from unfractionated leukocyte suspension ($p < 0,001$).

Conclusion. To study NETosis *in vitro* it is recommended to use an unfractionated leukocyte suspension obtained by sedimentation and standardized by the number of neutrophils (5×10^6 cells/ml).

Keywords: netosis, leukocyte suspension, neutrophil

Введение

Оценка уровня нетоза, сопровождающегося образованием нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (neutrophil extracellular traps, NETs), вызывает интерес у исследователей различного профиля. В литературе встречается несколько способов выделения нейтрофильных гранулоцитов (НГ) для дальнейшего изучения их NET-образующей способности, что, в свою очередь, сказывается на разнообразных и иногда противоречивых результатах. Традиционно выделение НГ проводят путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина [6]. Однако, данный способ, несмотря на высокую чистоту выделения (количество НГ $> 95\%$), обладает рядом недостатков. Так, ряд авторов указывают на более низкий количественный выход НГ от заявленного в протоколе выделения путем градиентного центрифугирования, что может затруднить работу с малыми объемами образцов [6, 11]. Имеются сообщения о снижении хемотаксической и фагоцитарной активности НГ, выделенных на градиенте плотности, в сравнении с гранулоцитами, полученными из лейкоцитарной взвеси [5, 10]. Кроме того, установлена зависимость количества клеток, полученных путем градиентного центрифугирования, от однородности популяции НГ по размеру и плотности, в противном случае, данный метод выделения может оказаться неэффективным [6].

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ уровня нетоза НГ, полученных из нефракционированной лейкоцитарной суспензии, и выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколла-верографина на примере здоровых лиц и пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом (ХРФ).

Методика

Объектом исследования были НГ периферической венозной крови 36 пациентов (16 мужчин и 20 женщин, возраст 29 лет (22; 37)) с ХРФ тяжелого течения в стадии ремиссии, которые наблюдались амбулаторно и/или проходили лечение в отделении иммунопатологии и аллергологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» г. Гомеля. Продолжительность заболевания составляла от 2 до 7 лет с частотой рецидивирования 6 и более раз в год, у 9 обследованных отмечалось непрерывно рецидивирующее течение. Контрольную группу составили 30 практически здоровых человек (16 мужчин и 14 женщин, возраст 30 лет (24; 40)).

Получение нефракционированной лейкоцитарной суспензии. Венозную кровь (5 мл) забирали в пластиковые пробирки с гепарином (10 Ед/мл), отстаивали при 37°C в течение 30 мин. под углом 45° , затем в вертикальном положении 15 мин. при комнатной температуре. Верхний слой плазмы удаляли, нижний слой плазмы и лейкоцитарную пленку собирали в отдельную пробирку и доводили фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) до концентрации 5×10^6 нейтрофилов/мл. В работе использовалась суспензия лейкоцитов с содержанием $75 \pm 10\%$ гранулоцитов (окраска 0,1% сафранином), жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим была не менее 95%.

Получение чистых клеточных культур. Венозную кровь (5 мл) забирали в пластиковые пробирки с гепарином (10 Ед/мл), отстаивали при 37°C в течение 30 мин. под углом 45° , затем в вертикальном положении 15 мин. при комнатной температуре. Для выделения НГ использовали двойной градиент плотности фиколла-верографина, при этом плотность верхнего слоя градиента

составляла $1,077 \text{ г/см}^3$, нижнего – $1,119 \text{ г/см}^3$ [6]. После удаления богатой тромбоцитами плазмы кровь разводили фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) в соотношении 1:1, наслаивали на ступенчатый градиент плотности фиколла-верографина и центрифугировали в течение 30 минут при 500 g . После центрифугирования на границе между градиентами появлялось кольцо гранулоцитов, которые переносили в центрифужную пробирку, трижды отмывали от градиента фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и доводили до концентрации 5×10^6 нейтрофилов/мл. Лейковзвесь содержала не менее 95% нейтрофилов (окраска 0,1% сафранином), жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим была не менее 95%.

Оценка уровня нетоза. Интенсивность процессов нетоза оценивали по методике И.И. Долгушина [2] в собственной модификации [1]. Клеточную взвесь инкубировали в течение 150 мин. при 37°C без стимулятора (спонтанный уровень; NETсп) и в присутствии секреторных продуктов *S. aureus* [9] (стимулированный уровень; NETст). После инкубации клеточную суспензию центрифугировали 5 мин. при 250 g , осадок ресуспендировали, делали тонкие мазки и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Микроскопировали с использованием иммерсионного увеличения ($\times 1000$), считали процентное содержание NET при просмотре 200 НГ.

Статистический анализ выполнен с использованием программы Statistica for Windows, v. 6.1 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и графическим способом. Дальнейший статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов ввиду отсутствия согласия данных с нормальным распределением. Результаты выражали в виде Me (25%; 75%), где Me – медиана, 25% – нижний квартиль, 75% – верхний. Для оценки различий в двух независимых группах использовали ранговый U-критерий Манна-Уитни. Сравнение двух зависимых выборок проводилось с использованием W-критерия Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы провели сравнение уровня нетоза НГ, полученных из лейкоцитарной суспензии, и выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколла-верографина, у здоровых лиц (рис. 1).

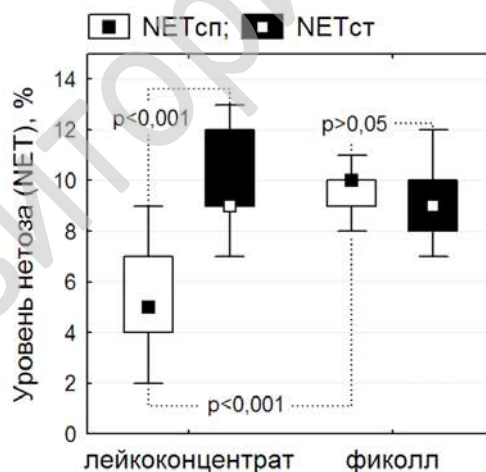


Рис. 1. NET-образующая способность нейтрофилов у здоровых лиц в зависимости от способа выделения

Анализ показателей NET-образующей способности НГ, полученных из лейкоконцентрата, выявил значимое повышение уровня стимулированного нетоза относительно спонтанного уровня образования NET (9,0% (9,0; 12,0) и 5,0% (4,0; 7,0) соответственно, $p < 0,001$), тогда как при градиентном разделении лейкоцитов различий между данными показателями выявлено не было (NETсп 10,0% (9,0; 10,0) и NETст 9,0% (8,0; 10,0)). В то же время, как видно из рис. 1, спонтанный уровень нетоза клеток, выделенных в градиенте плотности, оказался значимо выше по сравнению с аналогичным показателем при использовании нефракционированной лейкоцитарной суспензии ($p < 0,001$), тогда как при сравнении значений стимулированного нетоза (NETст) различий обнаружено не было.

На следующем этапе работы мы изучили NET-образующую способность НГ у пациентов с ХРФ. Полученные данные представлены на рис. 2.

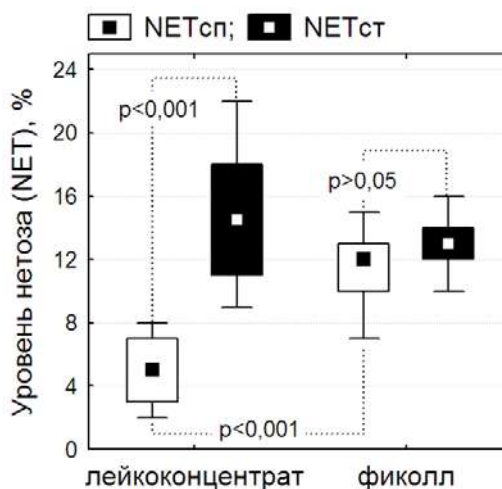


Рис. 2. NET-образующая способность нейтрофилов у пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом в зависимости от способа выделения

Как и у здоровых лиц, у пациентов с ХРФ, сравнительный анализ нетоза клеток, полученных из лейкоконцентрата, выявил значимое повышение стимулированного уровня относительно спонтанного (14,5% (11,0; 18,0) и 5,0% (3,0; 7,0) соответственно, $p < 0,001$). Уровень спонтанного нетоза НГ, выделенных путем градиентного центрифугирования, не отличался от значений нетоза при стимуляции (12,0% (10,0; 13,0) и 13,0% (12,0; 14,0) соответственно), и при этом был значимо выше показателя NETсп клеток, полученных из нефракционированной лейкоцитарной взвеси ($p < 0,001$).

Проведенные исследования выявили повышенный уровень спонтанного нетоза НГ, выделенных на градиенте плотности фиколла-верографина в сравнении с аналогичным показателем нетоза НГ, полученных из нефракционированной лейкоцитарной суспензии. Данная особенность была характерна как для здоровых лиц, так и для пациентов с ХРФ. Мы полагаем, что обнаруженные нами изменения могут быть связаны с неспецифической преактивацией NET-образующей способности НГ. Так, механическое воздействие на лейкоциты при их градиентном выделении (длительное центрифугирование, многократное отмывание и ресуспендирование), может дополнительно стимулировать реактивность НГ, на что указывает ряд авторов [5, 10]. Кроме того, полисахарид фиколл является одним из факторов, индуцирующих функциональную активность НГ, в частности, спонтанную генерацию кислородзависимых факторов бактерицидности [4, 7]. Важно отметить, что следствием обнаруженной нами неспецифической преактивации НГ является отсутствие различий между уровнем спонтанного и стимулированного нетоза, следовательно, оценка резервного NET-образующего потенциала лейкоцитов при градиентном выделении становится невозможной.

В свою очередь, использование нефракционированной лейкоцитарной суспензии является наиболее физиологичным, поскольку позволяет свести к минимуму травмирование и изменение функциональных свойств клеток путем сокращения времени выделения НГ и отсутствия активирующего влияния фиколла, что также существенно снижает трудоемкость исследования и не требует расхода дорогостоящих реактивов. Дополнительным преимуществом является возможность оценки NET-образующей способности НГ с учетом межклеточной регуляции, поскольку используется смешанная суспензия лейкоцитов, содержащая гранулоциты, агранулоциты, а также тромбоциты, образующие единую взаимосвязанную систему [8]. Кроме того, при получении НГ путем дифференциального центрифугирования в двойном градиенте плотности не учитывается субпопуляция низкоплотных нейтрофилов (low-density neutrophils), которая выделяется в одной фракции с мононуклеарными лейкоцитами [8]. Принимая во внимание то, что именно субпопуляция низкоплотных нейтрофилов обладает наиболее выраженной способностью к нетозу [3], использование нефракционированной смешанной суспензии лейкоцитов является наиболее целесообразным.

Выводы

1. Выявлен более высокий уровень спонтанного нетоза нейтрофилов, выделенных путем градиентного центрифугирования, относительно аналогичных показателей нетоза нейтрофилов, полученных из нефракционированной лейкоцитарной суспензии.
2. Уровень спонтанного нетоза нейтрофилов, выделенных на градиенте плотности фиколла-верографина, не отличался от уровня стимулированного нетоза.
3. Для изучения показателей нетоза *in vitro* рекомендуется использование нефракционированной лейкоцитарной суспензии, полученной путем отстаивания и стандартизированной по количеству нейтрофилов (5×10^6 клеток/мл).

Литература (references)

1. Гусакова Н.В., Ярец Ю.И., Гомоляко А.В. NET: охота продолжается // Наука и инновации. – 2017. – №4. – С. 68-72. [Husakova N.V., Yarets Y.I., Gomolyako A.V. *Nauka i innovacii*. Science and Innovation. – 2017. – N3. – P. 64-69. (in Russian)]
2. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю. Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите // Вестник РАМН. – 2010. – №4. – С. 26-30. [Dolgushin I.I., Shishkova Y.S., Savochkina A.Y. *Vestnik RAMN*. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. – 2010. – N4. – P. 26-30. (in Russian)]
3. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity // Seminars in Immunopathology. – 2013. – V.35, N4. – P. 455-463.
4. Maqbool M., Vidyadaran S., George E., Ramasamy R. Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils // The Medical Journal of Malaysia. – 2011. – V.66, N4. – P. 296-299.
5. Mosca T., Forte W.C. Comparative efficiency and impact on the activity of blood neutrophils isolated by percoll, ficoll and spontaneous sedimentation methods // Immunological Investigations. – 2016. – V.45, N1. – P. 29-37.
6. Quinn M.T., DeLeo F.R., Bokoch, G.M. Neutrophil Methods and Protocols. – New Jersey: Humana Press, 2007. – 551 p.
7. Rebecchi M., Ferreira N.N., Julian Y., Campa A. Oxidative metabolism and release of myeloperoxidase from polymorphonuclear leukocytes obtained from blood sedimentation in a Ficoll-Hypaque gradient // Cell Biochemistry and Function. – 2000. – V.18, N2. – P. 127-132.
8. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system // Blood. – 2014. – V.124, N5. – P. 710-719.
9. Veldkamp K.E., Heezius H.C., Verhoef J. et al. Modulation of neutrophil chemokine receptors by Staphylococcus aureus supernate // Infection and Immunity. – 2000. – V.68, N10. – P. 5908-5913.
10. Vuorte J., Jansson S.E., Repo H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay // Cytometry. – 2001. – V.43, N4. – P. 290-296.
11. Zhou L., Somasundaram R., Nederhof R.F. et al. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies // Clinical and Vaccine Immunology. – 2012. – V.19, N7. – P. 1065-1074.

Информация об авторах

Гусакова Наталья Викторовна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь. E-mail: gusanata@gmail.com

Гомоляко Андрей Викторович – кандидат медицинских наук, судебно-медицинский эксперт Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь. E-mail: hamaliaka@gmail.com

Железко Вероника Владимировна – аспирант очной формы кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь. E-mail: veronikazhelezko@mail.ru