

Генералов И. И.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Жерулик С. В.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Коротина О. Л.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Дядичкина О. В.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК МЕТОДАМИ МИКРОСКОПИИ СВЕТЛОГО ПОЛЯ

Сравнительно недавно (в 2004 г.) был открыт новый механизм антимикробного действия нейтрофилов [1]. Оказалось, что нейтрофильные гранулоциты после активации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, в состав которых входит ДНК, гистоны, а также специфические белки и ферменты гранул, такие как нейтрофильная эластаза и миелопероксидаза. Данные структуры были обозначены как «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (neutrophil extracellular traps, NETs или НВЛ). НВЛ изолируют и затем уничтожают грамположительные и грамотрицательные бактерии, клетки грибов и простейших. Если поглощаемый объект слишком велик для фагоцитоза, например, при паразитарных инфекциях, нейтрофилы способны ограничивать распространение патогенов путем образования НВЛ.

Считается, что по своей антимикробной эффективности НВЛ не уступают традиционному фагоцитозу. Вследствие этого формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек является важнейшим механизмом врожденного иммунного ответа [2].

Чрезмерная продукция NET может привести к системным патологическим состояниям. Имеются данные, что повышенное образование либо нарушение удаления (клиренса) НВЛ связаны с хроническими иммуновоспалительными неинфекционными заболеваниями, в частности, такими как васкулиты, системная красная волчанка, гестозы (преэклампсия). Показано участие НВЛ в метастазировании опухолевых клеток [2].

В целом можно заключить, что с одной стороны, НВЛ функционируют как эффективный антимикробный барьер, с другой — их избыток ведет к развитию воспалительных процессов и иным расстройствам.

Открытие нового иммунологического феномена НВЛ стимулировало разработку способов его выявления и дальнейшей количественной характеристики. Известные в настоящее время методы обнаружения ловушек основаны на визуализации компонентов НВЛ, располагающихся вне лейкоцитов. При этом основой ловушки является ДНК, выделяющаяся из ядра нейтрофила после его активации за

пределы клетки. Поэтому современные методы регистрации ловушек включают обнаружение внеклеточной ДНК активированных лейкоцитов. Все они используют высокочувствительные флюоресцентные красители, которые избирательно связывают ДНК ловушек (Sytox Green, пропидия йодид и мн. др.). После обработки красителями гранулоциты и ДНК ловушек определяют с помощью люминесцентной микроскопии [3].

Тем не менее, для выявления НВЛ пока мало применяется световая микроскопия в проходящем свете. Реакция Фельгена на ДНК с фуксинсернистой кислотой не получила распространения из-за трудоемкости методики. С другой стороны, известно, что краситель метиловый зеленый специфически связывается с ДНК, что уже использовалось ранее как для количественного определения самой ДНК, так и фермента ДНКазы.

Целью нашего исследования явилась разработка нового способа определения НВЛ с помощью микроскопии проходящего света в светлом поле. Различные варианты методики были апробированы при микроскопическом исследовании выделенных из крови культур лейкоцитов, мазков крови, отделяемого из патологических очагов, мазков-отпечатков из органов и тканей.

Материалы и методы. Способность гранулоцитов к образованию НВЛ оценивали у пациенток с карциномой молочной железы (66 человек), фиброаденомой молочной железы (26 человек), 20 беременных и 12 здоровых женщин, не имеющих соматической или инфекционной патологии, пациентов с хроническим периодонтитом в стадии обострения (26 человек).

Культуры лейкоцитов выделяли из гепаринизированной венозной крови на градиенте «фиколл-верографин» по общепринятой методике. В качестве индукторов ловушкообразования использовали 7,5 мкМ форбол 12-миристат 13-ацетат или микробные клетки *Staphylococcus aureus* в конечной концентрации 1×10^7 клеток/мл. Инкубацию гранулоцитов с индукторами проводили в течение 180 минут. По окончании инкубации на предметных стеклах готовили клеточные мазки, которые фиксировали спреем-фиксатором. У пациенток с опухолью молочной железы готовили мазки-отпечатки из тканей опухоли во время проведения интраоперационной биопсии. У пациентов с хроническим периодонтитом НВЛ определяли в фиксированных мазках, приготовленных из содержимого зубодесневого кармана. Подсчитывали количество НВЛ, лейкоцитов с десегментированным ядром и число неизмененных гранулоцитов. Полученные результаты выражали в процентах (медиана определения Me, интерквартильный размах).

В качестве метода сравнения для определения НВЛ применяли флюоресцентные красители Hoechst 33342 в концентрации 5 мкг/мл или 0,3 mM 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI). Учет результатов проводили с помощью люминесцентного микроскопа Биомед-6 (РФ), используя соответствующий набор светофильтров, иммерсионный объектив 100/1,25; окуляр 10/22.

Результаты и обсуждение.

В основе разработанного нами метода определения НВЛ лежит окрашивание ДНК ловушек красителем метиловым зеленым. Способ осуществлялся в 2 основных вариантах.

Для определения НВЛ в культурах гранулоцитов фиксированный препарат окрашивали растворами метилового зеленого (окрашивание ядер лейкоцитов и ДНК ловушек) и эозина (окрашивание цитоплазмы клеток и фона) с дальнейшей световой микроскопией препарата и подсчетом образовавшихся нейтрофильных ловушек. Использовали иммерсионный объектив микроскопа 100/1,25; окуляр 10/22.

Другой вариант методики позволяет достоверно определять НВЛ в мазках отделяемого из патологических очагов, мазках-отпечатках из органов, биопсийных срезах тканей. В этом случае на первом этапе производили гистохимическое окрашивание препарата с обнаружением ферментов миелопероксидазы или нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы. Данные ферменты высокоспецифичны для нейтрофилов и отсутствуют в популяциях лимфоцитов и макрофагов/моноцитов. Для этого окрашивание мазка проводили субстратными растворами 3,3'-диамино-бензидина (ДАБ) с пероксидом водорода либо нафтол-AS-D-хлорацетатом, и затем докрашивали препарат 5 % раствором метилового зеленого.

Результаты, полученные при сравнительном использовании люминесцентной и световой микроскопии для выявления НВЛ, достоверно не различались. Так, количество НВЛ гранулоцитов крови, стимулированных *S. aureus*, при люминесцентной микроскопии составило 16 [10–19] %, а при световой — 19 [15–29] % ($n = 20$; $p > 0,05$). У пациентов с периодонтитом количество ловушек в содержимом зубодесневом кармане было выше ($Me = 31$ [20,0;100,0]; $n = 26$), чем при активации НВЛ в гранулоцитах крови. Был выявлен ряд проб, где количество интактных гранулоцитов было ниже, чем количество образующихся ловушек. При выраженном воспалительном процессе НВЛ образуют сплошные поля в препарате, содержащие клетки системы иммунитета и клетки бактерий или грибов.

С помощью комбинированного окрашивания ловушек гистохимическим методом (например, ДАБ- H_2O_2 на миелопероксидазу и метиловый зеленый для ДНК нейтрофилов) удалось обнаружить НВЛ непосредственно в мазках-отпечатках карциномы молочной железы. В изученных препаратах ($n = 10$) выявлялось от 4 до 16 НВЛ на 200 ядросодержащих клеток. Данная методика повышает специфичность определения НВЛ непосредственно в тканях, отличая ловушки от внеклеточной ДНК, выделившейся из поврежденных клеток любого другого типа.

Установлено также, что наличие НВЛ в активированной культуре лейкоцитов достоверно чаще встречается в группе пациенток с карциномой молочной железы в сравнении с группой больных фиброаденомами ($p < 0,01$).

Выводы:

1. Разработан метод определения НВЛ с помощью световой микроскопии на основе взаимодействия ДНК нейтрофилов с красителем метиловым зеленым.
2. Комбинированное окрашивание нейтрофильных ловушек методами гистохимии позволяет выявлять НВЛ в отделяемом из патологических очагов и клеточных препаратах из тканей и органов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Neutrophil* extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // *Science*. 2004. Vol. 303, N 5663. P. 1532–1535.
2. *Brinkmann, V.* Neutrophil extracellular traps in the second decade / V. Brinkmann // *J. Innate Immun.* 2018. June 15. P. 1–8.
3. *Долгушин, И. И.* Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина. Москва : РАМН, 2009. 208 с.

Репозиторий БГМУ