

*А. В. ЖИЛКЕВИЧ¹, А. В. БОГДАНОВА^{2, 3}, Н. В. АМАЭГБЕРИ⁴,
Т. А. КУЛАГОВА², И. Э. АДЗЕРИХО¹, Т. Э. ВЛАДИМИРСКАЯ¹,
А. М. УСТЕМЧУК¹, Г. Н. СЕМЕНКОВА¹*

ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ДИНАМИКЕ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

¹*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь,*

²*Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета,
Минск, Беларусь,*

³*Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь,*

⁴*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
E-mail: bahdanavanastasya@gmail.com*

Введение. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) – клинический синдром, сочетающий в себе патологические состояния различной этиологии и патогенеза. Это заболевание характеризуется эндотелиальной дисфункцией, которая проявляется обилием эндогенных вазоконстрикторов по сравнению с вазодилататорами и сопровождается снижением продукции оксида азота и простациклина на фоне значительного увеличения количества эндотелина-1. Это приводит к ремоделированию легочных сосудов, повышению легочного сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии. Результатом таких изменений является развитие правожелудочковой недостаточности и преждевременная смерть больных [1].

Важнейшим процессом в патогенезе ЛАГ является воспаление. Установлена связь воспалительного процесса с ремоделированием легочных сосудов, прогрессирующим в плексиформную артериопатию [2]. При прогрессировании ЛАГ наблюдали повышение уровня инфильтрации легочной ткани воспалительными клетками, включая макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, активацию макрофагов/моноцитов и нейтрофилов, повышение концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в крови и альвеолярной жидкости [2, 3].

Одной из основных причин воспалительного патогенеза ЛАГ является оксидативный стресс, вызванный гиперпродукцией активных форм кислорода и хлора, основным источником которых являются активированные нейтрофилы [3]. В области воспаления эти клетки также секретируют протеолитические ферменты посредством секреторной дегрануляции и формируют нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ). НВЛ представляют собой крупные сетевидные структуры из деконденсированного хроматина с локализованными на нем белками. Основными компонентами НВЛ являются ДНК, гистоны, сериновые протеазы, нейтрофильная эластаза (НЭ), миелопероксидаза (МПО),

актин и др. Показано, что у пациентов с ЛАГ наблюдается высокая иммунореактивность к МПО в образцах легочной ткани наряду со значительным повышением концентраций МПО и НЭ в плазме крови. Следовательно, компоненты НВЛ могут являться важной терапевтической мишенью при ЛАГ.

Цель работы – исследовать формирование НВЛ в динамике развития ЛАГ в монокроталин-индуцированной экспериментальной модели.

Материалы и методы. В работе использованы: декстран-500, гистопак-1077, питательная среда RPMI-1640, монокроталин (МКТ), форбол 12-мириристан-13-ацетат (ФМА), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), fluoroshield (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия), анти-МПО FITC антитела (Immunotech, Франция), SYTOX Green (Invitrogen, США), первичные и 647-конъюгированные вторичные антитела к эластазе нейтрофилов (ABclonal, Китай).

Исследования проводили на 30 взрослых белых беспородных крысах самцах массой 250–300 г в соответствии с принципами биоэтики с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Для создания модели ЛАГ применяли 8-недельную МКТ-модель, как описано в работе [3].

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых и больных крыс в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике. Для исследования формирования внеклеточных ловушек использовали метод флуоресцентной микроскопии. Свежевыделенные нейтрофилы в среде RPMI помещали в чашки со стеклянным дном (Ibidi, Германия) в концентрации 300 000 клеток/мл, в некоторые образцы вносили ФМА в концентрации 0,1 мкмоль/л и культивировали 1, 2 и 3 ч при их адгезии к поверхности стекла. После этого к клеткам добавляли 20 нмоль/л специфического красителя для ДНК SYTOX Green и инкубировали 10 мин.

Образцы нейтрофилов для иммуноцитохимического анализа готовили следующим образом. Суспензию клеток помещали на покровные стекла и после адгезии фиксировали 2%-м раствором параформальдегида в течение 15 мин, затем дважды промывали фосфатным буфером. После этапа блокировки 2%-м БСА образцы инкубировали с антителами к эластазе и МПО нейтрофилов в течение 1–12 ч при температуре 4 °С. Затем к образцам добавляли специфический краситель для ДНК SYTOX Green (5 мкмоль/л) и инкубировали 10 мин. После этого образцы промывали фосфатным буфером и деионизированной водой, затем фиксировали Fluoroshield (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

НВЛ визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония) при LED возбуждении 470, 365 и 635 нм, используя объектив 60 × NA 1.2 WI Plan Apo VC (Nikon). Анализировали от 60 до 80 изображений размером 290 × 290 мкм и проводили подсчет НВЛ. Данные выражали как среднее число НВЛ в одном микроскопическом поле.

Результаты и их обсуждение. Чтобы установить роль НВЛ в прогрессировании ЛАГ, были исследованы образцы живых клеток, а также проведен

иммуноцитохимический анализ ДНК и связанных с НВЛ белков, таких как МПО и НЭ в фиксированных нейтрофилах. В норме нейтрофилы имеют сегментированные ядра, окруженные гранулами МПО и НЭ. Выявлено, что при формировании НВЛ в образцах регистрируются нитевидные и облакоподобные структуры с колокализацией ДНК, МПО и НЭ.

В качестве традиционного активатора формирования НВЛ использовался ФМА. В образцах живых клеток были получены микрофотографии НВЛ, окрашенные SYTOX Green. В контрольной группе (здоровые животные) в образцах нейтрофилов, культивируемых в течение 2 ч, среднее количество НВЛ в поле микроскопии составляло $1,3 \pm 0,8$. В группе животных с ЛАГ через 4 недели после индуцирования патологии количество НВЛ в микроскопическом поле составляло $2,0 \pm 0,2$, а через 8 недель – $2,9 \pm 0,7$, что указывает на 1,5-кратное (4 недели) и 2,2-кратное (8 недель) увеличение образования НВЛ у крыс с ЛАГ по сравнению с контрольной группой.

Для изучения начальных стадий формирования НВЛ проведен иммуноцитохимический анализ распределения НЭ, МПО и ДНК в нейтрофилах после 30-минутной адгезии. За этот период времени у части клеток появились начальные признаки НВЛ: потеря четкой сегментированности ядра с разрушением ядерной мембраны (переход от плотных ядерных долек к диффузному облакоподобному распределению ДНК); изменение локализации гранулярных белков (перераспределение МПО и НЭ из гранул в область ядра). Однако полная деконденсация хроматина, наблюдаемая через 2 ч, не регистрируется. В образцах нейтрофилов здоровых крыс нами зарегистрировано $0,8 \pm 0,3$ клетки в поле с признаками НВЛ. У крыс с ЛАГ количество клеток, формирующих НВЛ, превышало контрольные значения. В группе животных через 4 недели после индуцирования патологии количество НВЛ в микроскопическом поле составляло $1,8 \pm 0,6$, а через 8 недель – $3,3 \pm 0,8$. Следовательно, по мере прогрессирования ЛАГ нейтрофилы демонстрируют повышенную склонность к формированию НВЛ.

Выводы. Таким образом, спустя 4 и 8 недель развития МКТ-индуцированной ЛАГ увеличивается способность нейтрофилов к образованию НВЛ, что сопровождается увеличением выброса из клеток генетического материала, эластазы и миелопероксидазы. Такое праймирование нейтрофилов в сочетании с зарегистрированным нами ранее повышением их секреторной дегрануляции [3] могут быть ключевыми факторами роста уровней МПО/НЭ в легочной ткани при ЛАГ.

Литература

1. New insights in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension / J. Bordenave, L. Tu, L. Savale [et al.] // *Revue des Maladies Respiratoires*. – 2019. – Vol. 36, N 4. – P. 433–437.

2. Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats / C. Tang, Y. Luo, S. Li [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 133. – Art. 111081.

3. Анализ роли нейтрофилов в развитии воспаления в монокроталининдуцированной легочной артериальной гипертензии / Г. Н. Семенова, И. Э. Адзерихо, Н. В. Амаэгбери [и др.] // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2023. – Т. 6, №4. – С. 71–77.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Совет молодых ученых

МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ 2025

Тезисы докладов
XXII Международной
научной конференции
молодых ученых
(Минск, 16–18 сентября 2025 г.)

В четырех частях

Часть 2

Биологические
и медицинские
науки

Минск
«Беларуская навука»
2025