

УДК 616-092.4

DOI: 10.14427/jipai.2020.3.21

Метод определения нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек в биологических жидкостях с помощью двойного окрашивания

С.И. Генералов, О.В. Ищенко, Н.Ю. Коневалова, А.В. Фролова, С.В. Жерулик, Ю.А. Павлов, С.А. Сушкова

Витебский государственный медицинский университет

Detection of neutrophils and neutrophil extracellular traps in biological fluids by double staining assay

S.I. Generalov, O.V. Ishchenko, N.Y. Konevalova, A.V. Frolova, S.V. Zherulik, Y.A. Pavlov, S.A. Sushkova

Vitebsk State Medical University

Аннотация

Нетоз – недавно открытый способ гибели нейтрофилов, при котором образуются нейтрофильные внеклеточные ловушки. Эти структуры играют важную роль во многих патологических процессах. Целью данного исследования являлось создание способа определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в биологических жидкостях путем детекции специфического для нейтрофилов фермента – нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы и внеклеточной ДНК с использованием световой микроскопии. Разработанный метод основан на реакции азосочетания азотированного фуксина с α -нафтолом. В качестве материала для исследования использовали суспензии нейтрофилов, полученные из венозной крови здоровых доноров, асцитическую жидкость и мокроту. В материале определяли содержание сегментированных и десегментированных нейтрофилов, нейтрофильных внеклеточных ловушек, цитопластов. Выполнено сравнение данного метода с разработанным ранее методом определения нейтрофильных внеклеточных ловушек с помощью красителя Fast Corinth V Salt. В результате работы получен доступный для использования в клинико-диагностических лабораториях способ двухкомпонентного окрашивания нейтрофильных внеклеточных ловушек, определена внеклеточная активность нейтрофилов в биологических жидкостях данным методом.

Ключевые слова

Нетоз, нейтрофилы, определение нейтрофильных внеклеточных ловушек, фуксин, краситель Fast Corinth V Salt

Summary

Netosis is a recently discovered pathway of neutrophil death, which is followed by neutrophil extracellular traps formation. These structures play an important role in many pathological processes. The main goal of this study is to create a method for detection of neutrophil extracellular traps in biological fluids by identification neutrophil-specific enzyme - naphthol-AS-D-chloroacetate esterase and extracellular DNA using bright field microscopy. The developed method is based on the azo coupling reaction of nitried fuchsin with α -naphthol. The cultures of neutrophils obtained from the venous blood of healthy donors, ascitic fluid and sputum were used as a material for the study. The number of segmented and desegmented neutrophils, neutrophil extracellular traps and cytoplasm was determined. This method was compared with the previously developed test for the determination of neutrophil extracellular traps with Fast Corinth V Salt dye.

Keywords

Netosis, neutrophils, neutrophil extracellular traps detection, fuchsin, Fast Corinth V Salt stain.

Введение

Нейтрофилы являются наиболее распространенным типом лейкоцитов человека и играют важную роль в системе иммунитета. Их антимикробная активность обеспечивается различными процессами: от дегрануляции нейтрофильных гранул с последующим высвобождением различных ферментов (миелопероксидазы (МПО), эластазы, матриксных металлопротеиназ), хемокинов и цитокинов, до фагоцитоза патогенов с последующей их деструкцией внутри фаголизосом при помощи продукции активных форм кислорода (АФК) и ферментов. Также существует еще один, недавно открытый, способ реализации антимикробного иммунитета нейтрофилами – образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps, NETs или НВЛ) в процессе нетоза [1].

Впервые на способность нейтрофилов к особой форме клеточной гибели, отличной от некроза и апоптоза с выделением клеточной ДНК обратила внимание в 1996 году группа ученых под руководством Ф. Сендо [2]. В 2004 году А. Бринкман и В. Зихлински сформулировали понятие нетоза и НВЛ, подробно описав данный феномен [3].

Нейтрофильная внеклеточная ловушка представляет собой расположенный вне клетки деконденсированный хроматин, который плотно связан с гистонами и гранулярными протеинами. Внеклеточные гистоны, в свою очередь, обладают антибактериальной активностью [4].

Образование НВЛ начинается с распознавания нейтрофилом различных стимулов и индукторов, как бактериальной, так и химической природы (опсонины, цитокины, форбол-1,2-миристан-1,3-ацетат). Одну из ключевых ролей в ловушкообразовании играет активация фермента НАДФН-оксидазы, ответственного за генерацию большого количества АФК. Образовавшиеся АФК, в свою очередь, стимулируют миелопероксидазу, что приводит к высвобождению из нейтрофильных гранул эластазы с ее транслокацией в ядро и последующей деконденсацией хроматина. Также значимую роль играет фермент пептидил-аргинин-деиминаза 4, который, активируясь под действием АФК и кальций-ионофора, принимает участие в цитрулировании гистонов и дополнительной деконденсации хроматина с разрушением структуры ядра [5, 6, 7, 8].

Было отмечено, что гранулоциты пациентов с хронической гранулематозной болезнью с дисфункцией НАДФН-оксидазы менее склонны к ловушкообразованию. Однако, под воздействием

некоторых стимулов, таких как иономицин и никотин, возможна активация нетоза в обход НАДФН-оксидазы (NOX-independent pathway) через митохондриальную продукцию АФК [7, 9].

В конечном итоге происходит деконденсация хроматина, десегментирование ядра, разрушение клеточной мембраны и выход ядерного и гранулярного материала наружу с образованием внеклеточных нитей и сетей, прошитых антибактериальными протеинами [10]. Оказавшиеся в данной ловушке бактерии с высокой вероятностью погибают [3].

На данном этапе изучения ловушкообразования вышеуказанный процесс носит название литического или суицидального нетоза. Альтернативой ему является витальный нетоз (non-lytic netosis). Его механизм изучен слабо. Считается, что данный процесс не столь зависит от активных форм кислорода и является формой ответа на инфекцию. При этом происходит быстрый выброс ядерного материала и некоторой части гранулярных протеинов. Однако клетка при этом не погибает, оставляя после себя так называемый цитопласт – ануклеарный нейтрофил. При этом цитопласты продолжают частично выполнять основные функции нейтрофилов – фагоцитоз и хемотаксис до своей окончательной гибели [11].

Основной функцией ловушкообразования, вне зависимости от способа нетоза, является осуществление антибактериального иммунитета. Однако существует значительное количество патологических эффектов, связанных с данным процессом.

Поскольку активация ловушкообразования возможна без бактериальных стимулов, лишь под действием различных провоспалительных цитокинов и иммунных комплексов, избыточное образование НВЛ наблюдается при аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваниях [12]. Например, высокое содержание НВЛ сопутствует таким патологическим состояниям как псориаз, ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа, воспалительные заболевания кишечника и др [12, 13, 14, 15]. В свою очередь, нейтрофильные внеклеточные ловушки способствуют развитию аутоиммунного ответа, поскольку внутриклеточные компоненты нейтрофильных внеклеточных ловушек играют роль молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs) [16]. Это приводит к усилению аутоиммунных процессов. Особого внимания заслуживает открытое в 2018 году усиление активности Т-хелперов 17 типа цитопластами, образующимися в процессе витального нетоза. Данные Т-лимфоциты

стимулируют нейтрофилы, что приводит к образованию порочного круга. Этот механизм был показан при изучении нейтрофильной формы бронхиальной астмы [17].

В случае системных инфекций, развития сепсиса, избыточное накопление компонентов нейтрофильных внеклеточных ловушек приводит к усилению повреждения тканей, полиорганной недостаточности, аутоиммунным реакциям, цитотоксичности и дисфункции эндотелия [16].

Локальное накопление НВЛ приводит к активации фактора Виллебранда, XII фактора свертывания крови, что вместе с развитием дисфункции эндотелия сосудов, способствует развитию тромбоза [18, 19]. Повреждение эндотелия усугубляет процессы атеросклероза, что вместе с тромбозом способствует ишемическому поражению органов и тканей.

Также описано нетоз-ассоциированное метастазирование, при котором нейтрофильная внеклеточная ловушка служит субстратом для фиксации опухолевых клеток, а ферменты нейтрофильных гранул способствуют их экстравазации и закреплению в тканях с последующим ростом метастатических очагов [20].

Исходя из вышесказанного, несмотря на позитивный эффект при борьбе с инфекциями, избыточная активация ловушкообразования несет высокий риск усиления различных патологических процессов. Это обуславливает необходимость разработки доступных методов изучения и определения нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Первоначально изучение нейтрофильных внеклеточных ловушек проводили при помощи электронной микроскопии [3]. В дальнейшем основной методикой изучения нетоза стала флуоресцентная микроскопия с одновременным определением внеклеточного ядерного материала, гистонов и нейтрофильных ферментов [21].

Однако, данные методики не применимы для большинства лабораторий медицинских учреждений, поскольку требуют дорогостоящих светочувствительных красителей и специального оборудования для люминесцентной микроскопии.

Ранее был разработан способ однокомпонентного окрашивания нейтрофильных внеклеточных ловушек 5% раствором метилового зеленого – красителя, высокоспецифичного по отношению к ДНК с последующей микроскопией в проходящем свете [22]. Недостатками данного способа являются невозможность подтвердить нейтрофильную принадлежность экстраклеточного ядерного материала и невозможность определения наличия анулеарных цитопластов.

Для компенсации вышеуказанных недостатков методика была доработана с помощью определения специфического для нейтрофилов фермента – содержащейся в азурофильных гранулах нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы.

Целью данного исследования явилась разработка метода окрашивания нейтрофильных внеклеточных ловушек с помощью определения нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы гексаазотированным фуксином и последующий анализ НВЛ в биологических жидкостях.

Методы исследования

Выделение нейтрофилов

Материалом для исследования служили: 20 образцов суспензии нейтрофилов, выделенные из венозной крови здоровых доноров, 4 препарата лейкосуспензии, выделенной из асцитической жидкости двух пациентов с раком молочной железы и метастатическим поражением печени, 6 образцов мокроты пациентов с гипостатической пневмонией.

Выделение нейтрофилов из венозной крови проводилось по следующей методике.

Забор периферический венозной крови осуществляли утром натощак из локтевой вены в стерильные пластиковые пробирки в объеме 5 мл. В качестве антикоагулянта использовался 3,2% раствор цитрата натрия. Также проводили забор 1 мл крови без антикоагулянта для последующего центрифугирования с целью получения сыворотки. Заранее готовили двойной градиент плотности «фиколл-верографин». Нижний слой градиента получали путем доведения раствора Histopaque®-1077 раствором верографина до плотности 1,119 г/см³. В качестве верхнего слоя использовали Histopaque®-1077 плотностью 1,077 г/см³. В центрифужную пробирку последовательно наслаивали 1.5 мл нижнего и 1.5 мл верхнего градиента. О правильном приготовлении градиента свидетельствовало наличие четкой границы раздела фаз плотностей.

Далее на приготовленный раствор наслаивали 3 мл полученной венозной крови. После чего проводили первое центрифугирование при 700 g в течение 30 минут. После центрифугирования биоматериал в пробирке распределялся следующим образом – первый слой составляла плазма крови, затем кольцо мононуклеаров, после слой градиента низкой плотности, под которым располагалось кольцо нейтрофилов. Ниже находился слой градиента высокой плотности. На дно пробирки оседали эритроциты.

Слои над кольцом нейтрофилов утилизировали, в то время как слой нейтрофилов отбирали в отдельную стерильную центрифужную пробирку. Далее первичную клеточную суспензию разводили до 5 мл стерильным изотоническим раствором 0,01 М натрий-фосфатного буфера (phosphate buffered saline, PBS), pH 7,4 при температуре 36,6°C и центрифугировали на протяжении 10 минут с угловым ускорением равным 200 g. Затем снимали надосады, осевшие на дно нейтрофилы разводили до 5 мл раствором PBS и снова центрифугировали при 200 g. Данный этап выполняли дважды. Это было сделано с целью очистки клеточной суспензии от остатков градиента плотности, поскольку содержащиеся в градиенте полисахариды могут способствовать избыточной агрегации нейтрофилов между собой с последующей активацией. По этой же причине не использовался этап седиментации и лизиса эритроцитов раствором трехпроцентного декстрана [23]. После отмывки гранулоциты ресуспендировали в вышеуказанном растворе PBS до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Выделение нейтрофилов проводили при комнатной температуре. Слишком низкие температуры могут привести к спонтанной холодной активации нейтрофилов. Жизнеспособность клеток составила 90-95% (окраска 0,4% трипановым-синим).

Пробы делили на три группы: с добавлением собственной сыворотки донора в концентрации 0,2% и 2% для ингибирования спонтанного ловушкообразования согласно Go Kamoshida [24] и без добавления сыворотки.

Далее в стерильных условиях на предметные стекла закрепляли силиконовые камеры, в которые вносили по 200 мкл взвеси нейтрофилов.

Активацию ловушкообразования индуцировали добавлением 5 мкл раствора форболмиристин-ацетата (ФМА) к 200 мкл клеточной суспензии до конечной концентрации ФМА в 50 нг/мл. В контрольную камеру добавляли 5 мкл стерильного физиологического раствора. После чего нейтрофилы инкубировали в закрытых камерах в течение трех часов, при температуре 36,6°C. Фиксация препаратов проводилась в течение 10 минут при комнатной температуре, путем добавления в камеру раствора параформальдегида до конечной концентрации в 4%.

Лейкосуспензия из асцитической жидкости была получена путем центрифугирования 1,5 мл жидкости на 1,5 мл верхнего слоя градиента при угловой скорости в 500G в течение 15 минут. После чего лейкоосуспензию отмывали от остатков градиента по аналогичной методике.

Мокроту от пациентов получали с использованием вакуум-аспиратора; образец разводили изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:10.

Инкубацию и фиксацию препаратов проводили аналогично.

Приготовление субстрата для определения нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы проводили следующим образом. В 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) добавляли 1 мг нафтол-AS-D-хлорацетата и перемешивали при комнатной температуре до полного растворения.

В качестве контрольного метода окрашивания использовалось разработанное ранее определение нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы при помощи красителя Fast Corinth V Salt (Sigma) [25].

Для этого 8 мг красителя Fast Corinth V Salt растворяли в 20 мл 0,02М трис-малеинового буфера pH 6.3 при температуре 37°C, постоянно помешивая. Получившийся краситель пропускали через фильтр. Затем добавляли 800 мкл раствора субстрата, приготовленного по вышеуказанному методу. Краситель заливали в емкость для вертикального окрашивания предметных стекол, после чего погружали туда приготовленные по вышеописанному способу препараты содержащие нейтрофилы. Окрашивание проводили в темноте, в течение 5 минут при температуре 37°C. После окрашивания препараты промывали в дистиллированной воде и высушивали. Затем проводили доокрашивание 5% раствором метилового зеленого. Раствор метилового зеленого готовили заранее – 50 мг красителя растворяли в 1 мл 1% раствора уксусной кислоты с содержанием 5% этанола. При необходимости проводили экстракцию возможных примесей (кристаллического метилового фиолетового) из красителя хлороформом.

Альтернативное окрашивание проводили с помощью гексаазотированного фуксина способом описанным далее.

Модифицированный метод определения нейтрофилов и НВЛ при помощи фуксина

Прототипом разработанного способа являлась методика цитохимического определения нафтол-AS-D хлорацетатэстеразы гексаазотированным фуксином [26]. В процессе расщепления данным ферментом субстрата – нафтол-AS-D-хлорацетата, образуется α -нафтол, который способен вступать в реакцию азосочетания с азосоединениями. Для осуществления данной реакции с раствором фуксина, краситель необходимо азотировать. Гексаазотирование фуксина

проводили следующим способом: 40 мг фуксина растворяли в 1 мл 2М подогретого до 37°C раствора соляной кислоты. Параллельно в 1 мл дистиллированной воды растворяли 40 мг NaNO₂. Азотирование – экзотермическая реакция. При перегревании солей азотированных солей возможен их распад с выделением азота [27]. Поэтому растворы фуксина и нитрита натрия объединяли на холоду и перемешивали до приобретения красителем желто-коричневого цвета.

Далее к 19 мл 0,02М PBS pH 7,4 добавляли 100 мкл красителя и 1 мл раствора субстрата. О готовности красителя к использованию свидетельствует приобретение им малинового оттенка. Раствор годен к окрашиванию на протяжении 30 минут. Об истечении пригодности красителя свидетельствует появление осадка.

На возможные ошибки в процессе приготовления красителя указывают следующие признаки. Черный цвет рабочего раствора после объединения фуксина и нитрита натрия свидетельствует о неполном гексаазотировании. Также об ошибке на стадии гексаазотирования свидетельствует активное выделение азота в виде обильной бурой пены на поверхности рабочего раствора. из-за распада красителя в результате перегрева. Появление фиолетового цвета после добавления рабочего раствора в PBS говорит об избытке фуксина и его неполном растворении в соляной кислоте. Выпадение красителя в осадок сразу после добавления субстрата в итоговый раствор свидетельствует о некачественном субстрате. Все вышеуказанные признаки являются факторами риска неспецифического окрашивания препаратов.

Выделение, активацию инкубацию и фиксацию нейтрофилов проводили по способам, указанным выше.

После фиксации препарата силиконовую камеру с предметного стекла удаляли. Затем погружали стекло с фиксированными лейкоцитами и нейтрофильными внеклеточными ловушками в емкость для вертикального окрашивания мазков с целью предотвращения возможного выпадения осадка на исследуемый материал. Окрашивали в течение 10 минут, после чего препарат промывали в дистиллированной воде и высушивали. Для определения ядерного материала предметное стекло 5 минут окрашивали 5% раствором метилового зеленого, приготовленного по вышеописанному способу.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 10. Результаты

были представлены в процентах, определяли медиану изучаемых показателей (ME, 25%; 75%) и коэффициент вариации метода. Изображения препаратов были получены с помощью специализированной программной платформы Leica Application Suite. Микроскопия проводилась при помощи светового микроскопа Leica 2000, оснащенного камерой Leica DFC 295, на иммерсионном объективе 100/1,25, объективе 63/0,75, объективе 40/0,65.

Результаты и обсуждение

1. В процессе исследования нами был разработан метод определения нейтрофильных внеклеточных ловушек с помощью детекции нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы. Во время микроскопирования препаратов подсчитывали различные морфологические структуры: нейтрофилы с сегментированным ядром – неизмененные нейтрофилы, десегментированные нейтрофилы – начальный этап ловушкообразования, нейтрофильные внеклеточные ловушки – экстраклеточное скопление ядерного материала и прореагировавшего субстрата, и цитопласты – ануклеарные формы нейтрофилов, лишенные ДНК, но сохранившие относительно целостную структуру (см рис. 1, 2, 3). Следует отметить, что на данном этапе изучения нетоза – именно совместное определение ядерного материала и специфических для нейтрофилов ферментов является золотым стандартом окрашивания НВЛ [22]. Однако при использовании предлагаемого нами способа отсутствует необходимость в люминесцентной микроскопии, дорогостоящих флуоресцирующих красителях и специальных фильтрах. Кроме того, фиксированные и окрашенные препараты не требуют особых условий хранения и доступны для повторного анализа. Метод подходит для большинства медицинских лабораторий общего назначения, где применяется световая микроскопия.

2. Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек в суспензии клеток нейтрофилов, полученных из венозной крови здоровых доноров.

Было проведено окрашивание 10 проб здоровых доноров с помощью гексаазотированного фуксина и 10 проб здоровых доноров с помощью красителя Fast Corinth V salt. В свою очередь, материал из каждой пробы был разделен на две группы – активированную и не активированную. Каждая из групп была также разделена на три подгруппы – в зависимости от содержания добавленной сыворотки. Затем подсчитывали

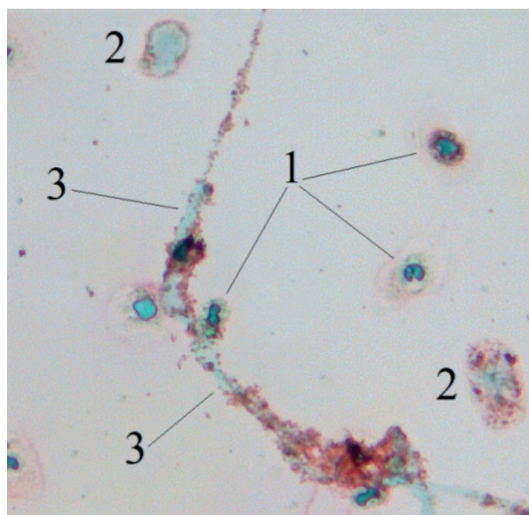


Рис. 1. Сегментоядерные нейтрофилы (1), десегментированные нейтрофилы – начальный этап ловушкообразования (2), нейтрофильные внеклеточные ловушки (3). Увеличение 40X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым

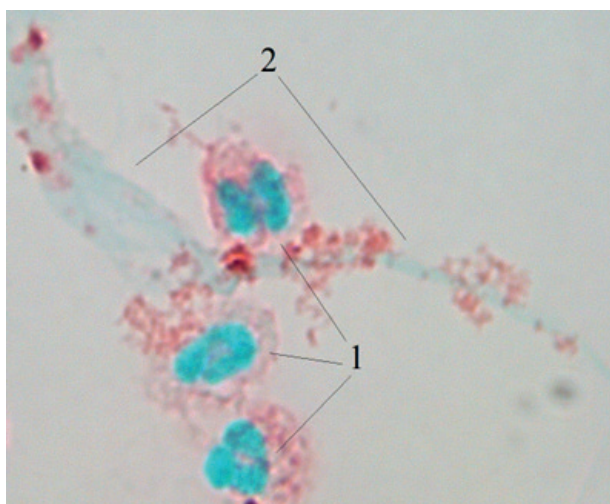


Рис. 2. Сегментоядерные нейтрофилы (1), нейтрофильная внеклеточная ловушка (2). Увеличение 100X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым

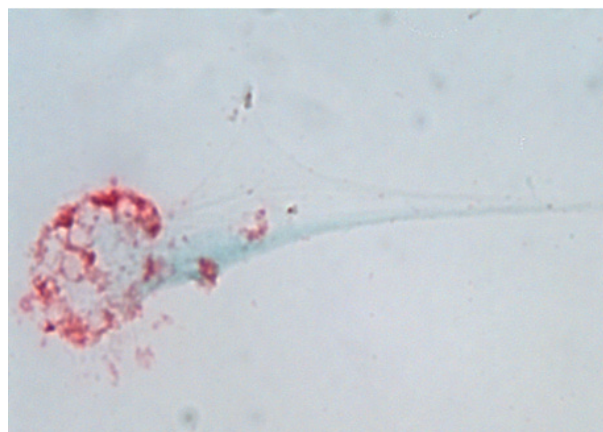


Рис. 3. Начинающееся формирование цитопласта и нейтрофильной внеклеточной ловушки. Увеличение 100X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым

процентное содержание различных морфологических структур.

Количество нейтрофильных внеклеточных ловушек определенных в активированных образцах без добавления собственной сыворотки донора при окрашивании с помощью гексаазотированного фуксина составило: 14,5% (нижний и верхний квартиль 13,0; 16,0). Коэффициент вариации метода внутри одного определения

составил 9,8%. При окрашивании с помощью Fast Corinth V Salt число нейтрофильных внеклеточных ловушек составило 15% (нижний и верхний квартиль 13,0; 17,0). Коэффициент вариации метода внутри определения – 11,3%. При сравнении двух методик окрашивания по критерию Мана-Уитни, отсутствуют статистически значимые различия между методиками ($p=0,99$). Смещение по тесту Бланда-Альтмана в зависи-

мости от измеряемого параметра колеблется от 0,5 до 1. Полученные данные свидетельствуют о равнозначности двух методов.

При сравнении уровней ловушкообразования в образцах с добавлением или без добавления собственной сыворотки донора было выявлено увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек при уменьшении объема сыворотки, что согласуется с данными литературы [24] (см. рис. 4, 5). Аналогичным образом увеличивалось количество НВЛ в активированных препаратах в сравнении с

неактивированными ($p=0,007$ по критерию Вилкоксона).

3. Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек в мокроте и асцитической жидкости.

3.1. Определение НВЛ в мокроте.

При помощи гексаазотированного фуксина были окрашены и проанализированы 6 препаратов мокроты пациентов с гипостатическими пневмониями (рис 6-7). Были обнаружены следующие структуры нейтрофильных гранулоцитов: сегментоядерные нейтрофилы - 77,4%, десегментированные нейтрофилы - 10,4%, цитопласты

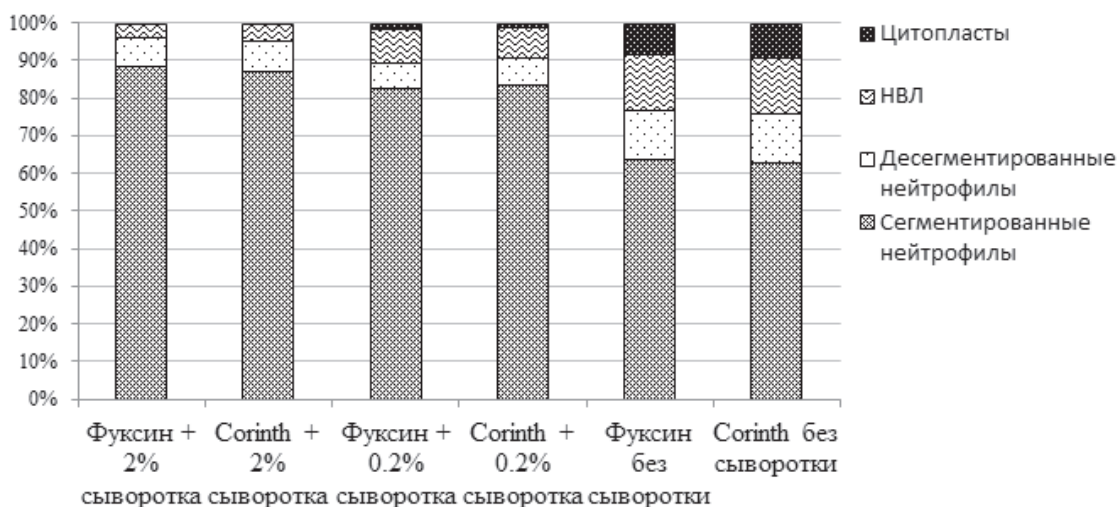


Рис. 4. Процентное содержание различных морфологических структур в активированных образцах после трех часов инкубации

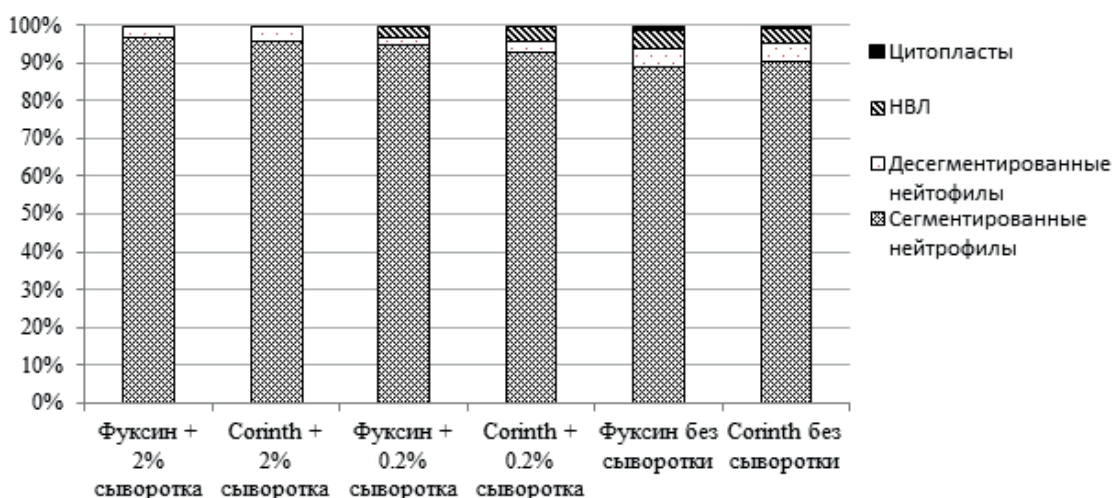


Рис. 5. Процентное содержание различных морфологических структур в неактивированных образцах после трех часов инкубации

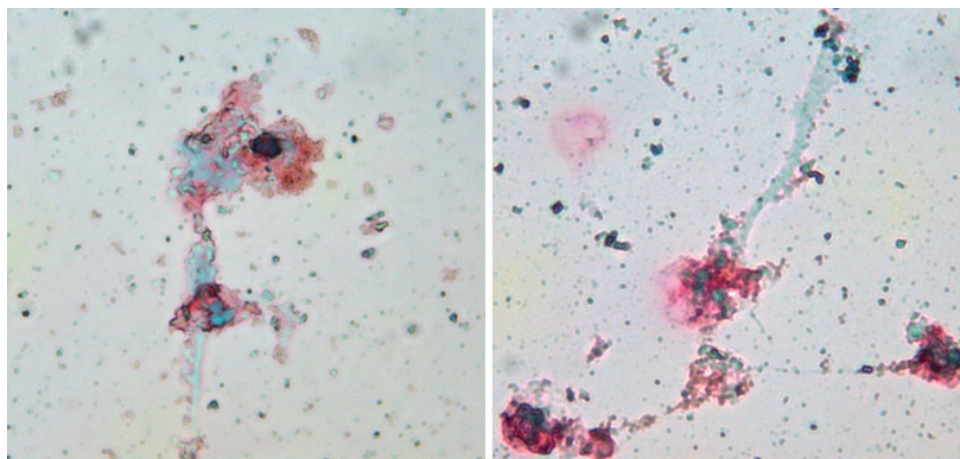


Рис. 6-7. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в мокроте. Увеличение 63X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым

- 0,8% и нейтрофильные внеклеточные ловушки - 11,4%. Коэффициент вариации определения нейтрофильных внеклеточных ловушек составил 10,01%.

3.2. Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек в асцитической жидкости.

Окрашивание выполнялось по методике, аналогичной способу окрашивания нейтрофилов, полученных из венозной крови, без внесения модификаций. Было исследовано 4 препарата лейкосуспензии, полученной из асцитической жидкости пациенток с раком молочной железы и метастатическим поражением печени.

В асцитических жидкостях при данных заболеваниях преобладали клетки лимфоцитарного ряда. Содержание десегментированных нейтрофилов составило 8% нейтрофильных внеклеточных ловушек – 2,75 % от общего числа нейтрофильных гранулоцитов.

Выводы

1. Разработана методика микроскопического определения нейтрофильных внеклеточных ловушек с помощью двойного окрашивания

фуксином и метиловым зеленым в проходящем свете.

2. Разработанный способ окрашивания равнозначен предложенному ранее методу определения нейтрофильных внеклеточных ловушек при помощи красителя Fast Corinth V Salt, однако он проще в использовании, не требует строгого соблюдения светового режима и является более доступным, поскольку основан на использовании фуксина, повсеместно применяемого в биохимии и микробиологии.
3. Предлагаемый способ позволяет подтвердить нейтрофильное происхождение внеклеточной ДНК, в отличие от однокомпонентных методов, основанных на использовании только ядерных красителей.
4. Разработанный способ окрашивания одинаково применим для определения нетоза в различных средах и препаратах в зависимости от задач исследования.

Исследование проводилось по гранту БРФФИ, договор № М20М-046. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература

1. Amulic B., Cazalet C., Hayes G., et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*. 2012; Vol. 30: 459–489. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.

2. Fujiro Sendo, et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996; Vol. 59: 229-240. DOI: 10.1002/jlb.59.2.229.

3. Brinkmann V., Reichard U., Zychlinsky A., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; Vol. 303: 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.

4. Hoeksema M., van Eijk M., Haagsman H. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiology*. 2016; Vol. 11(3): 441-453. DOI: 10.2217/fmb.15.151.

5. Wang Y., et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap

- formation. *J. Cell Biol.* 2009; Vol. 184(2): 205–213. DOI: 10.1083/jcb.200806072
6. Li P., et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; Vol. 207 (9): 1853–1862. DOI: 10.1084/jem.20100239
7. Nobuhiro D., et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPHoxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; Vol. 112(9): 2817–2822. DOI: 10.1073/pnas.1414055112
8. Lood, C. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine.* 2012; Vol. 22 (2): 146–153. DOI: 10.1038/nm.4027
9. Hosseinzadeh A., Thompson P., Segal B., et al. Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.* 2016; Vol. 100: 1105–1112. DOI: 10.1189/jlb.3AB0815-379RR.
10. Leshner M., et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* 2012; Vol. 3(307). DOI: 10.3389/fimmu.2012.00307
11. Bryan G., Bjorn P., Craig N., et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine* 2012; Vol. 18(9): 1386-1393. DOI: 10.1038/nm.2847
12. Glennon-Alty L., Hackett AP., Chapman EA., et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 2018; Vol. 125: 25–35. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049
13. Berezin A. Neutrophil extracellular traps: the core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 2018; Vol. 13(5):3017–3023. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.07.010
14. Apel F., Zychlinsky A., Kenny E., The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2018; Vol. 14: 467–475. DOI: 10.1038/s41584-018-0039-z
15. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V., Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015; Vol. 14: 633–640. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.03.002
16. Denning L., Monowar A., Gurien S., et al. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front. Immunol.* 2019; Vol 10: 2536. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02536.
17. Krishnamoorthy N., Douda D., Bruggeman T., et al. Neutrophil cytoplasts induce T H 17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. *Science immunology.* 2018; Vol. 3(26): 4747. DOI: 10.1126/sciimmunol.aao4747
18. Brill, A. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* 2012; Vol 10: 136–144. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
19. Von Bruhl M. L. et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 2012; Vol. 209: 819–835. DOI: 10.1084/jem.20112322.
20. Wang W., Zhang J., Zheng N., et al. The role of neutrophil extracellular traps in cancer metastasis. *Clinical and Translational Medicine.* 2020; Vol. 10(6): e126. DOI: 10.1002/ctm2.126
21. De Buhr N. and von Köckritz-Blickwede. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of Immunology Research.* 2016; Vol 2016: 13. DOI: x.doi.org/10.1155/2016/4604713
22. Дядичкина О.В., Коротина О.Л., Радецкая Л.Е. Возможность люминесцентной и световой микроскопии при определении нейтрофильных внеклеточных ловушек. *Вестник ВГМУ.* 2014; Т.13(5): 81-86.
23. Fuchs A., Abeer U., Goosmann C., et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; Vol. 176(2): 231–241. DOI: 10.1083/jcb.200606027
24. Kamoshida G., Nishida S., Kikuchi H., et al. Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions. *FEBS Open Bio.* 2017; Vol 7(6): 877–886. DOI: 10.1002/2211-5463.12222
25. Генералов И.И., Жерулик С.В., Коротина О.Л., Генералов С.И., Патент ВУ № 23078. 2020.06.30. МПК G 01N 33/48 (2006.01); патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. Национальный центр интеллектуальной собственности.
26. Yam L. and Crosby W. Cytochemical Identification of Monocytes and Granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971; Vol. 55(3): 283–290. DOI: 10.1093/ajcp/55.3.283.
27. Кривенько А. П. Условия реакции диазотирования. Термический контроль / А.П. Кривенько. Ароматические диазо- и азосоединения: учебно-методическое пособие / А.П. Кривенько, Н.В. Поплева. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та., 2012. С. 12.

Сведения об авторах

Генералов Сергей Игоревич – аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33. Sig752@mail.ru, 8-033-3926628

Ищенко Оксана Владимировна – д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33. oksana_js200272@mail.ru, 8-025-763-79-71

Коневалова Наталья Юрьевна – д.м.н., профессор, проректор по учебной работе ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33.

Фролова Аэлита Валерьевна – д.б.н., профессор кафедры клинической микробиологии ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33.

Жерулик Софья Валерьевна – ассистент кафедры онкологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33.

Павлов Юрий Александрович – врач-интерн УЗ Витебская областная клиническая больница; 210037, г. Витебск, ул. Воинов-интернационалистов, 37.

Сушкова Светлана Александровна – студентка 4 курса лечебного факультета ВГМУ; 210009, г. Витебск, ул. П. Бровки, 33.

Поступила 31.07.2020 г.