

ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Генералов С. И., Сушкова С. А.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь
Sig752@mail.ru*

Введение. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) – это сетеподобные структуры, образующиеся в процессе нетоза – особой формы гибели нейтрофила. Каркас нейтрофильной внеклеточной ловушки представляет сеть из нитей ДНК нейтрофила и деконденсированного хроматина, по которой распределены гистоны и содержимое нейтрофильных гранул. Образование НВЛ начинается после воздействия на клетку разных стимуляторов. *In vitro* для изучения ловушкообразования чаще всего применяют форбол-12-мирикат-13-ацетат. *In vivo* в роли активаторов выступают провоспалительные цитокины, антигены бактерий, вирусов, антитела и многое другое. После связывания стимулятора с паттерн-распознающим рецептором происходит выход кальция из эндоплазматического ретикулума с последующей активацией НАДФ-оксидазного комплекса. Это приводит к валовому накоплению активных форм кислорода (АФК). АФК повреждают гранулы и ядерную оболочку, инициируя смешивание гранулярного и ядерного содержимого. Затем под действием миелопероксидазы, эластазы, катепсина В и пептидил-аргинин-деиминазы 4 происходит деконденсация хроматина и цитрулинирование гистонов. Изначальная структура хроматина утрачивается и остатки ядра приобретают десегментированную форму. Мембрана нейтрофила разрывается и ядерный материал в комплексе с гранулярным содержимым выходит наружу в форме сетеподобного облака. Попавшие в подобную «ловушку» патогены погибают под действием нейтрофильных ферментов, антибактериальных протеинов и гистонов. Тем самым образование НВЛ – важный компонент системы иммунитета и недостаток ловушкообразования считается иммунодефицитом. Однако избыточная стимуляция ловушкообразования приводит к повреждению тканей организма содержимым нейтрофила, стимуляции аутоиммунных процессов и многим другим патологическим эффектам. Это обуславливает двойственное значение ловушкообразования для организма. В частности, показана корреляция уровней внеклеточной ДНК НВЛ с частотой обострений при бронхиальной астме. Особого внимания заслуживает описанное у пациентов с бронхиальной астмой усиление активности Т-хелперов 17 типа продуктами нетоза. Данные Т-лимфоциты в свою очередь стимулируют интактные нейтрофилы, что приводит к образованию порочного круга.

Основным действующим компонентом в процессе ловушкообразования выступают нейтрофильные ферменты. Образование НВЛ сопровождается

выбросом большого числа ферментов во внеклеточное пространство, что может привести к изменению соответственной сывороточной ферментативной активности у пациентов.

Цель исследования – определение спонтанного и индуцированного нетоза в сочетании с определением ферментативной активности сыворотки у пациентов с бронхиальной астмой (БА).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 24 пациента, поступивших в аллергологическое отделение ВОКБ с аллергической формой БА либо подозрением на БА. 11 пациентов были с легким течением БА, 5 – со средним течением БА. Из них 3 пациента находились в состоянии обострения, у 3 была установлена гиперреактивность бронхов с сопутствующими аллергическими заболеваниями, однако диагноз БА не был выставлен. В процессе исследования исключены 3 пациента с установленной в процессе обследования ОРВИ и 2 пациента с хроническим бронхитом. 15 пациентов входили в возрастную группу 18-30 лет, 4 – в возрастную группу 30-50 лет и 5 пациентов были старше 50 лет.

Материалом для исследования спонтанного и индуцированного ловушкообразования послужили нейтрофилы периферической венозной крови пациентов, выделенные на градиенте плотности Histopaque. Активацию ловушкообразования проводили форбол-12-миристан-13-ацетатом. Для определения НВЛ был использован разработанный ранее метод [1]. В основе данного способа лежит определение нейтрофильной ДНК метиловым зеленым. Нейтрофильное происхождение внеклеточной ДНК подтверждали гистохимическим определением нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы при помощи гексаазотированного фуксина. НВЛ превышали размер интактных гранулоцитов и определялись как скопления ядерного материала и локализованного фермента (рисунок). Затем считали процент НВЛ от общего числа нейтрофилов.

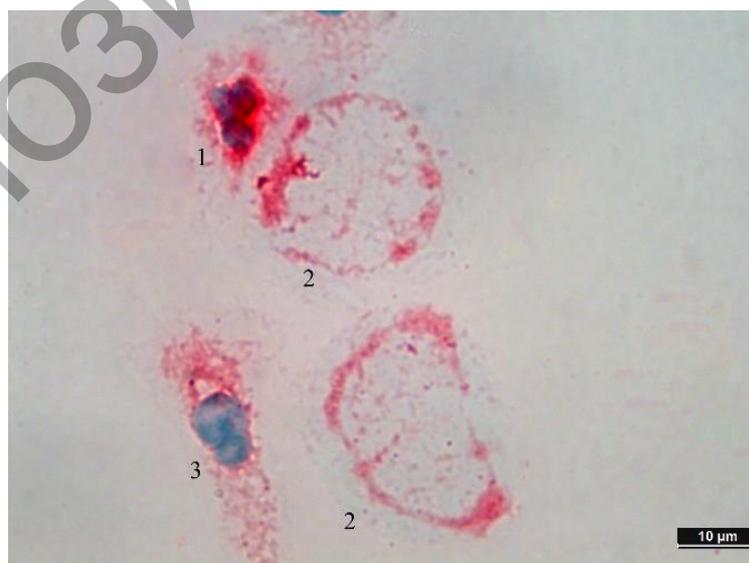


Рисунок – Сегментированный нейтрофил (1), НВЛ (2), начало десегментации ядра (3). Увеличение 100×. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым

Материалом для исследования ферментативной активности послужила выделенная из венозной крови сыворотка пациентов.

Определяли катепсин-В-подобную, БАПНА-амидазную и каталазную активность сыворотки методами, описанными ранее. Результаты выражали в условных единицах (Ед), соответствующих единицам оптической плотности [2].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием STATISTICA v.10.0. Определяли медиану (Me), верхний и нижний квартиль изучаемых параметров, а также коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R).

Результаты исследований. Показатели спонтанного нетоза у пациентов с БА без обострения составили: Me: 4 (1; 6)%, индуцированного Me: 16 (10; 25)%, при этом индуцированное ловушкообразование превышает аналогичные показатели у здоровых лиц – Me 11,6 (9,5; 13,7)% [3]. Показатели активности катепсина В составили 0,27 (0,23; 0,34) Ед, БАПНА-амидазной активности, 0,08 (0,06; 0,1) Ед, каталазной активности, 0,48 (0,22; 0,81) Ед. При этом каталазная активность у пациентов без обострения БА была выше, чем у пациентов в состоянии обострения (0,48 и 0,13, $p=0,02$). Были обнаружены некоторые статистически значимые ($p<0,05$) корреляции исследуемых параметров – у пациентов с БА БАПНА-амидазная и каталазная активность слабо коррелировала с индуцированным ловушкообразованием ($r=0,6$). Катепсин В подобная активность, напротив, обратно коррелировала с БАПНА-амидазной активностью ($r=0,6$). Не обнаружено статистически значимых различий между изучаемым параметрами при сравнении пациентов с разной степенью тяжести БА, разными показателями спирографии, диагнозом БА и гиперреактивностью бронхов, что можно объяснить отсутствием в исследовании пациентов с тяжелой формой БА. Однако была обнаружена статистически значимая корреляция между уровнями активности катепсина В и спонтанным ловушкообразованием в группе пациентов 18-30 лет ($r=0,62$), что можно объяснить возрастными особенностями системы иммунитета.

Выводы. Показатели спонтанного нетоза у пациентов с БА составили: Me: 4 (1; 6)%, индуцированного Me: 16 (10; 25)%. Обнаружена корреляция индуцированного ловушкообразования с каталазной и БАПНА-амидазной активностью. Показано снижение каталазной активности у пациентов с обострениями БА.

Литература:

1. Генералов С. И., Ищенко О. В., и др. Метод определения нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек в биологических жидкостях с помощью двойного окрашивания // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2020. – № 3. – С. 21-29.

2. Жерулик С. В., Луд Н. Г., и др. Ферментативная активность сыворотки крови, абзимная активность IgG и IgA, свободная сывороточная ДНК и образование внеклеточных ловушек нейтрофилами у пациенток с новообразованиями молочной железы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2017. – № 3. – С. 41.

3. Бедина С. А., Мозговая Е. Э., и др. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической крови пациентов ревматоидным артритом: изучение нового цитруллинсодержащего аутоантигена // Медицинская иммунология – 2021. –Т. 23, № 5 – С.1165-1170.

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS FORMATION AND BLOOD SERUM ENZYME ACTIVITY IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Generalov S. I., Sushkova S. A.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Sig752@mail.ru

In this study we investigated the percentage of spontaneous and induced netosis and serum enzymatic activity in patients with asthma. The following data was obtained: induced netosis was 16 (10; 25) % and spontaneous netosis was 4 (1;6) %. We found the decrease of serum catalase activity in patients with asthma exacerbation compared with the rest of patients. Also correlations between tripsine-like, BAPNA-amidase and catalase enzymatic activities were observed.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НЕБУЛАЙЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ СРЕДИ ВРАЧЕЙ-ПЕДИАТРОВ

Генец В. Т., Новицкая А. О., Мулярчик О. С.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

ГУЗ «Детская центральная городская клиническая поликлиника»

Гродно, Беларусь

valeryiaidrysa@gmail.com

Введение. В современной медицине наибольшую популярность в лечении заболеваний дыхательных путей занимает ингаляционная терапия. Эффективность лечения зависит не только от выбора лекарственного препарата, но и от способа доставки этого препарата к органам-мишеням.

На сегодняшний день метод ингаляционной терапии как нельзя лучше прижился в педиатрической практике, ведь педиатры не понаслышке знают о трудностях назначения лекарственных средств привычным, энтеральным способом, в особенности, если это касается детей раннего возраста. Для доставки лекарственных препаратов непосредственно в дыхательные пути используют следующие ингаляционные устройства: дозированный аэрозольный ингалятор, дозированный порошковый ингалятор и небулайзер.

Небулайзер – это устройство, которое преобразует жидкость в мелкодисперсный аэрозоль. Благодаря тому, что вещество распыляется на сверхмалые частицы, лекарственное средство попадает во все отделы дыхательных путей. Преимущества данного метода: достижение быстрого терапевтического эффекта в сравнении с таблетированными формами, меньший риск развития побочных реакций.