

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ НА ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЛОВУШКИ

© 2019 г. И. В. Самусева^{1*}, А. Ю. Савочкина¹, К. В. Никушкина¹,
И. В. Емельянов^{1,2}, Т. И. Никонова¹, М. А. Зотова¹

*E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

В работе представлены результаты по анализу динамики образования внеклеточных сетей ДНК нейтрофилами, выделенными из периферической крови и их фрагментации. В ходе эксперимента было установлено, что дезоксирибонуклеаза I (ДНКаз I) расщепляет ДНК – основу внеклеточных ловушек. Вероятно, способность секретировать этот ферментный компонент у некоторых патогенных бактерий (*S. pyogenes*, *S. aureus* или *S. pneumoniae*) объясняет их способность к высвобождению из экстрацеллюлярных структур.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные сети, нейтрофильные ловушки, ДНКаз I

DOI: 10.31857/S102872210006544-3

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самусева Ирина Владимировна. Тел.: +79227344234 (моб.).

E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

Авторы:

Самусева И. В., м. н. с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Савочкина А. Ю., д. м. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никушкина К. В., к. м. н., в. н. с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Зотова М. А., к. м. н., научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Емельянов И. В., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никонова Т. И., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками врожденного иммунитета [1], их основной функцией является уничтожение

патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и паразиты, а также предотвращение их распространения в организме. Это самые многочисленные, но короткоживущие клетки белой крови. Они являются главными в разрушении микробицидных компонентов, а также вирусов [2]. Нейтрофилы оснащены богатым набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцировано реагировать на малейшие изменения окружающей среды. Они первыми приходят в очаг воспаления, где проявляют разнообразные виды активности [3]. Нейтрофилы могут находиться в двух функциональных состояниях: в редокс-исходном и праймированном. Известно, что активация нейтрофилов периферической крови происходит на фоне праймированного состояния [4]. Праймирующий стимул вызывает метаболическую перестройку, приводящую к активации клетки, следствием его влияния является усиление ответа на последующую активацию. В активированном состоянии нейтрофил может оказывать свое действие на объект, вызвавший его активацию, различными способами: фагоцитировать и уничтожить его в фаголизосомах или выделять наружу бактерицидные продукты, которые представляют собой содержимое гранул [1,3,6]. Открытие

нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и установление их антимикробного эффекта как важнейшего звена врожденного иммунитета, безусловно, явилось началом нового этапа в исследовании функций нейтрофильных гранулоцитов. Формирование внеклеточных ловушек может осуществляться только активированными нейтрофилами. Эффект антимикробных веществ во внеклеточном пространстве усиливается в структурах НВЛ [7]. Известно, что нейтрофильные внеклеточные ловушки способны захватывать и уничтожать микроорганизмы. Это объясняется тем, что захваченные микробные агенты подвергаются высокой локальной концентрации антимикробных белков, таких как нейтрофильная эластаза, бактерицидный/индуцированный протеин и гистоны. Большинство патогенов уничтожаются после того, как захватываются внеклеточно расположенными сетями ДНК [7], однако есть ряд бактерий способных избегать захвата и киллинга.

Исходя из этого, целью данного исследования было разработать метод разрушения экстрацеллюлярных сетей нейтрофилов, выделенных из периферической крови *in vitro* для дальнейшего изучения влияния различных факторов на процессы деградации внеклеточных сетей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (г. Челябинск). Были обследованы 16 здоровых не беременных женщин. Средний возраст составил $26,5 \pm 3,3$ года. У всех доноров была забрана периферическая венозная кровь в 1 фазу менструального цикла. Критериями включения являлись добровольное согласие на обследование, оформленное в письменном виде. Отсутствие отклонений в нормативных показателях общего гематологического анализа крови, выраженной эндокринной и соматической патологии. Все женщины, принявшие участие в данном эксперименте подтверждали отсутствие приема гормональных препаратов, а также имели концентрации прогестерона, эстрадиола, лютеинизирующего гормона в сыворотке крови в пределах нормального репродуктивного диапазона. У всех женщин проводилось микробиологическое исследование для определения состава микрофлоры половых путей. Методом световой иммерсионной микроскопии подвергались мазки, окрашенные метиленовым синим и по Граму. Для получения

чистой фракции нейтрофилов периферическую венозную кровь забирали у женщин из локтевой вены, добавляли гепарин из расчета 10 ЕД («Гедеон-Рихтер», Hungary) на 10 мл крови. Затем к 2 мл гепаринизированной венозной крови добавляли 3 мл стерильного физиологического раствора (0,9% раствор NaCl), полученную смесь наслаивали на градиент плотности стерильных растворов фикола-верографина (Pharmacia, Sweden; Spofa, CSSR). Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,075–1,077, нижнего – 1,093–1,095. Каждый градиент использовали в объеме 2 мл. Через 40 минут центрифугирования при 1500 об/мин., температуре 4 °С, на границе между градиентами образуется кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, а на границе между 1,077 градиентом и плазмой крови – кольцо мононуклеаров. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные пластиковые пробирки и отмывали от градиента стерильным раствором Хенкса путём центрифугирования при 1500 об/мин., 4 °С два раза по 7 минут. Клеточную взвесь стандартизовали до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Далее полученные аликвоты инкубировали с раствором Хенкса (контроль), клеточными активаторами 4-форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и ДНКазой I. Эндонуклеазу добавляли в разные временные промежутки инкубации при температуре 37 °С градусов. Оценивали процент внеклеточных сетей ДНК на 5, 10, 20, 30, 120 минутах инкубации. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica for Windows (v.10.0; Statsoft Inc.). При обработке полученных данных использовали методы описательной статистики и дисперсионный анализ (ANOVA). Парные сравнения в рамках дисперсионного комплекса проводили с использованием критерия достоверно значимой разности Тьюки. Эффекты и межгрупповые различия в дисперсионном анализе считали значимыми при $p < 0,05$. Полученные данные представлены в виде средних значений и их 95%-ных доверительных интервалов (95% ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования было установлено, что в отсутствие клеточных индукторов и фермента активного роста внеклеточных нитей ДНК не происходит, и не превышает 4%. Минимальное необходимое время для образования внеклеточных сетей в присутствии клеточного

индуктора не микробной природы составляет 15 минут, причем максимальное их значение приходится на 30-минутный интервал и составляет 22%. Установлено, что ДНКаза I фрагментирует ДНК-остов экстрацеллюлярных сетей, что приводит к их разрушению. При инкубации с клеточным активатором и ферментом снижение количества внеклеточных нейтрофильных сетей зависит от продолжительности инкубации с последним, и имеют значимые различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные настоящего исследования свидетельствуют и подтверждают способность ряда бактерий продуцирующих ДНКазы избегать внутри- и внеклеточного захвата и киллинга внеклеточными ловушками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Семенов Б. Ф., Зверев В. В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2007, 4; 93–100. [Semenov B. F., Zverev V. V. The concept of creating a rapid immunological defense against pathogens. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2007, 4; 93–100.]
2. Herant E. Mechanisms of neutrophil phagocytosis. Journal of cell science 2003, 19; 45–50
3. Скулачев В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло, Соросовский образовательный журнал, 1996, 2; 23–27. [Skulachev V. P. Oxygen in a living cell: good and evil, Soros Educational Journal 1996, 2; 23–27].
4. Halliwell B, Gutteridge J., Modulating A. Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance/ Halliwell B. Biology 1998, 1 (45); 734–740
5. Гольдштейн Н. И. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды. Биохимия, 2002, 67; 194–204. [Goldstein N. I. Active forms of oxygen as vital components of the air environment. Biochemistry 2002, 67; 194–204].
6. Delanty N., Dichter M. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurologica Scandinavica 1998, 9; 145–153.
7. Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: диссертация доктора медицинских наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2012; 212. [Savochkina A. Y. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, detection methods, biological role: dissertation of the doctor of medical sciences. Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, 2012; 212].

EVALUATION OF THE EFFECT OF ENDONUCLEASE ON EXTRACELLULAR NEUTROPHILIC TRAPS

© 2019 I. V. Samuseva^{1*}, A. Y. Savochkina¹, K. V. Nikushkina¹, I. V. Yemelyanov^{1,2}, T. I. Nikonova¹, M. A. Zotova¹

*E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

¹South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 02.04.2019

The paper presents the results of the analysis of the dynamics of the formation of extracellular DNA networks by neutrophils isolated from peripheral blood and their fragmentation. During the experiment, it was found that deoxyribonuclease I (DNase I) cleaves DNA – the basis of extracellular traps. The ability to secrete this enzyme component in some pathogenic bacteria (*S. pyogenes*, *S. aureus* or *S. pneumoniae*) probably explains their ability to release from extracellular structures.

Key words: neutrophils, neutrophil extracellular networks, neutrophil traps, DNase I

Authors:

Samuseva I. V., ✉ Junior Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia.
E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru;

Savochkina A. Y., MD, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Nikushkina K. V., PhD, Leading Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Zotova M. A., PhD, Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Emelyanov I. V., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Nikonova T. I., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia.