

Открытие нейтрофильных
внеклеточных ловушек- новый этап
в изучении морфогенеза и функций
нейтрофилов

MICRO

Подготовили студенты 2 курса
Петрицев Виталий
Фененко Александра

MICRO

План

- Защитные механизмы нейтрофилов
- Открытие NET`s
- Строение NET`s
- Сравнение апоптоза и NET`s
- Эксперименты с целью изучения NET`s
- Влияние эстрогенов на образование NET`s
- Выводы

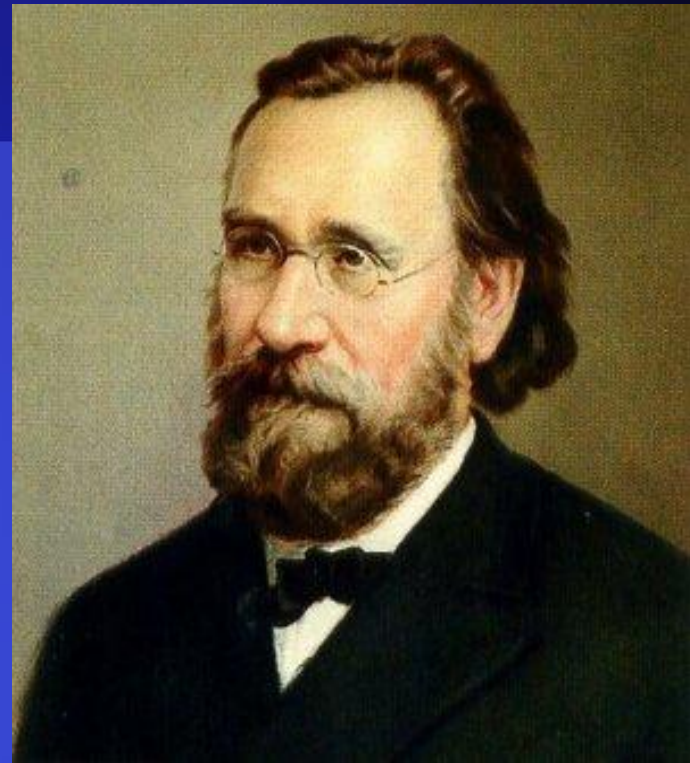
Защитные механизмы нейтрофилов

- ✓ Фагоцитоз
- ✓ Выделение содержимого гранул во
внеклеточную среду
- ✓ Внемитохондриальное образование
противомикробных АФК

MICRO

Фагоцитоз

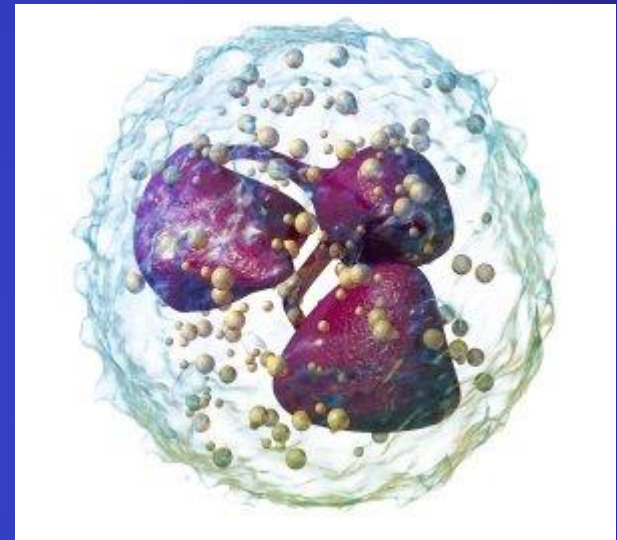
Открытие фагоцитоза И. И. Мечниковым в 1882г. сделано в ходе прижизненного микроскопического изучения прозрачных форм низших беспозвоночных, выловленных у берегов Сицилии.



MICRO

Выделение содержимого гранул во внеклеточную среду

Нейтрофилы активируются вторгшимися МПГ и захватывают их после предварительной опсонизации своей плазмолеммой с последующим переносом в фагосому. Далее фагосомы, сливаясь с первичными (азурфильными), вторичными (специфическими) и третичными гранулами, формирует



MICRO

Внемитохондриальное образование противомикробных АФК

После активации МПГ NADPH-оксидазы собираются на мембране фагосом и передают электроны кислороду для образования АФК (O_2 , H_2O_2 , $HOCl$)

MICRO

ОТКРЫТИЕ NET`S

V. Brinfmann и соавторы в 2004г. Методы исследований :

- ❖ СЭМ –сканирующая электронная микроскопия
- ❖ ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- ❖ КИФЦ- метод конфокальной иммунофлюоресцентной цитохимии

MICRO

СТРОЕНИЕ NET`S

MICRO

Главным компонентом фибрилл-ловушек является ДНК. На глобулярных доменах NET`s находятся ДНК-гистоновые комплексы (H2A-H2B-DNA) и нейтрофильная эластаза.



MICRO

СРАВНЕНИЕ АПОПТОЗА И НЕКРОС



MICRO

Апоптоз

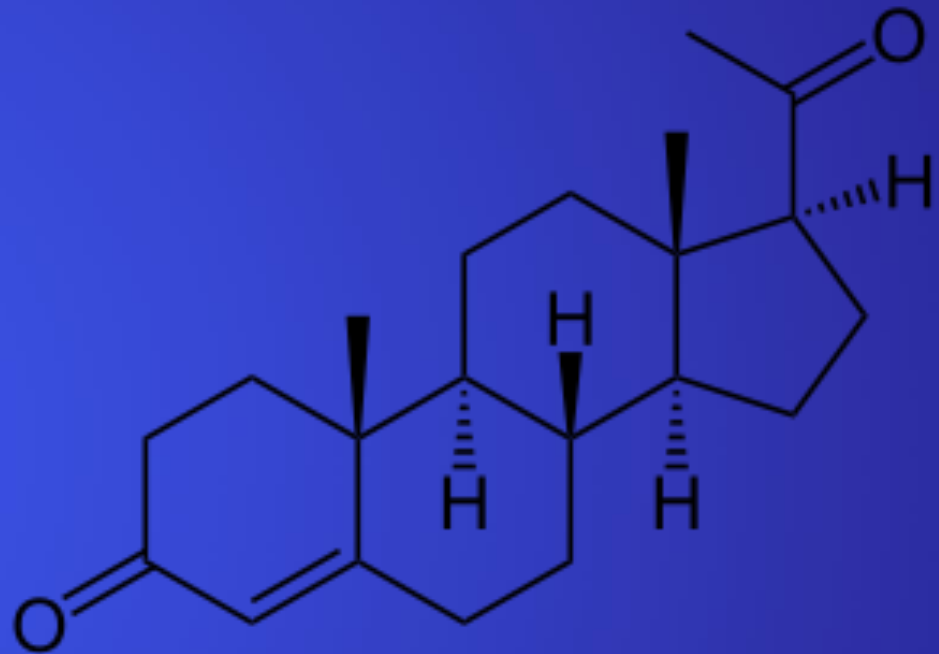
- Конденсация хроматина с фрагментацией ДНК без повреждения оболочки ядра и вакуолизации цитоплазмы при сохранении гранул интактивными .

Немоз

- Ядра теряют сегментированную форму , их фрагменты сливаются с образованием гомогенной массы без разделения на эу- и гетерохроматин , но оболочка ядра сохраняется .

MICRO

ВЛИЯНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА НА NET`S

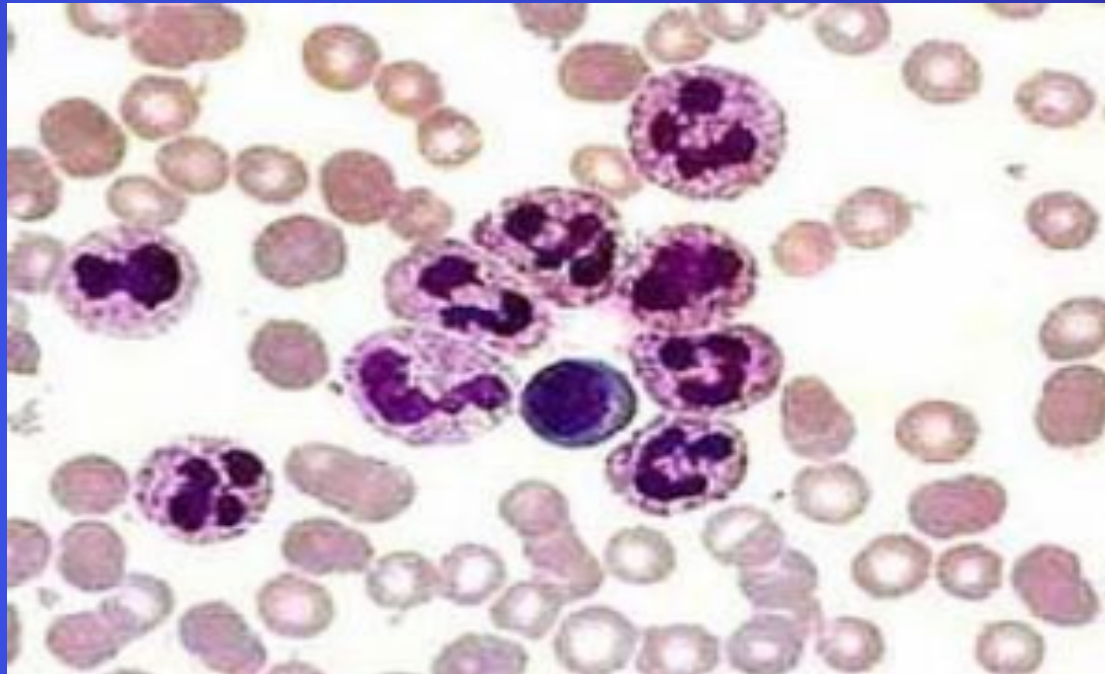


MICRO

- Возможность нормальной функции репродуктивной системы у здоровых женщин детородного периода обеспечивается наличием иммунологических барьеров и нормальным функционированием иммунорегуляторных механизмов.
- Иммунная система женского репродуктивного тракта специфически регулируется половыми стероидными гормонами. В этой многочисленной группе ведущая роль с точки зрения контроля репродуктивной функции принадлежит эстрогенам, прогестерону и глюкокортикостероидам.

MICRO

- Показано, что половые гормоны могут влиять на неспецифический иммунный ответ путем модуляции количества и функций нейтрофилов.

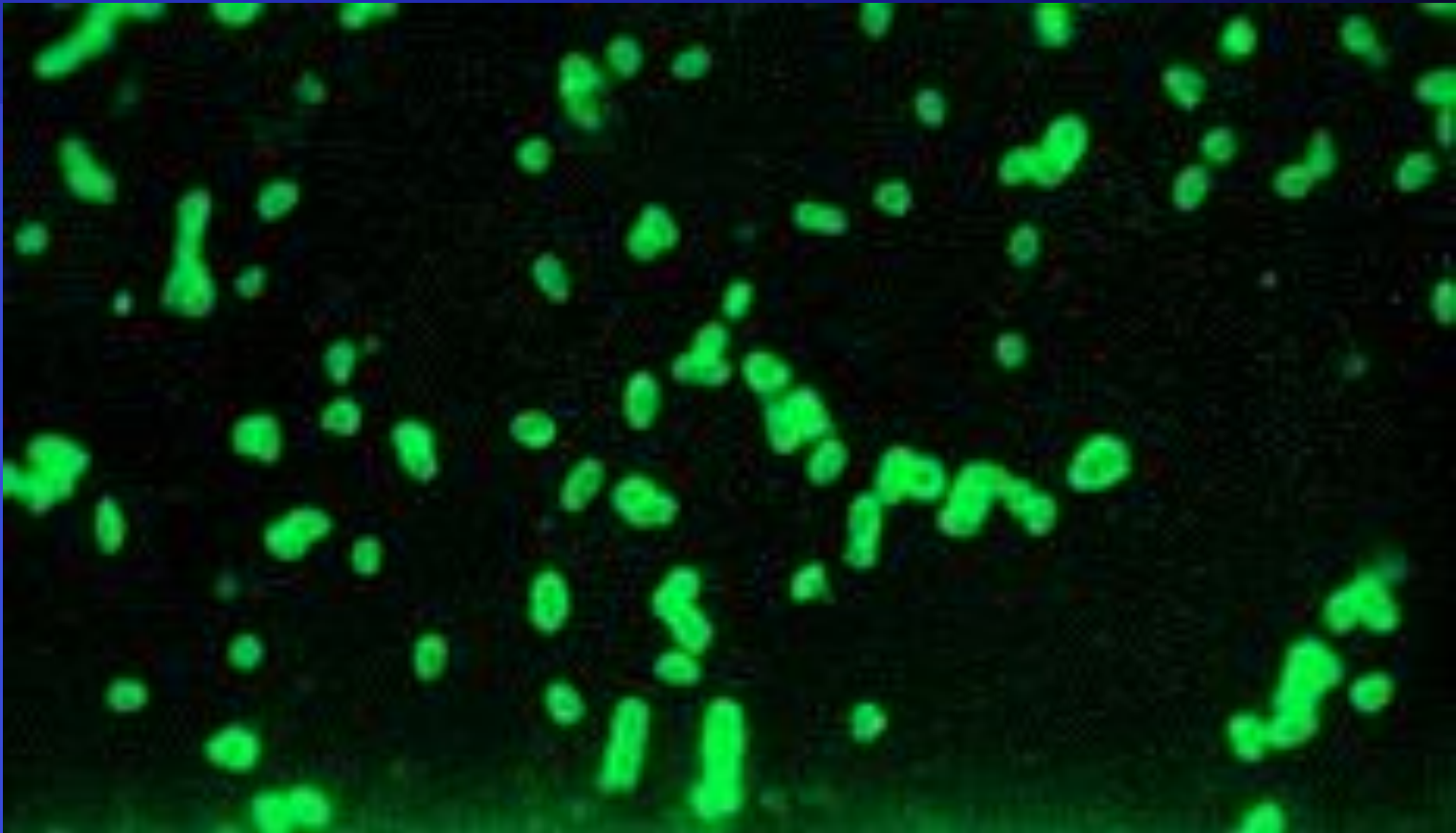


MICRO

Нейтрофилы традиционно относят к фагоцитирующим клеткам, которые благодаря ряду уникальных свойств (высокая подвижность, наличие мощных бактерицидных и цитотоксических продуктов) рассматриваются как высокопрофессиональные «убийцы», составляющие своеобразный «отряд быстрого реагирования» в системе врожденной противoinфекционной защиты организма. В 2004 г. немецким и американскими учеными была открыта и идентифицирована новая функция нейтрофилов – формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET`s – Neutrophil Extracellular Traps; NET`s). NET`s представляют собой сети внеклеточных волокон ДНК, которые связывают, обезвреживают и уничтожают патогенные микроорганизмы с помощью антимикробных белков. Ловушки связывают микроорганизмы, как грамположительные, так и грамотрицательные, предотвращают их распространение и обеспечивают высокую местную концентрацию антимикробных агентов.

MICRO

Материалы и методы

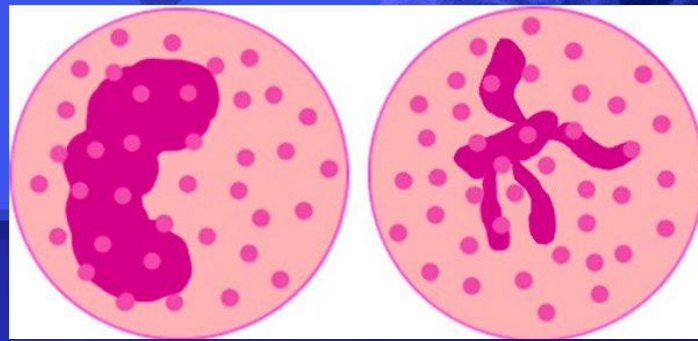


MICRO

Обследованы 15 условно здоровых небеременных женщин в возрасте 18–35 лет в первую фазу менструального цикла. У женщин был определен эндогенный уровень прогестерона методом иммуноферментного анализа для исключения из исследования тех, у кого показатели концентрации гормона выходили за пределы нормы.

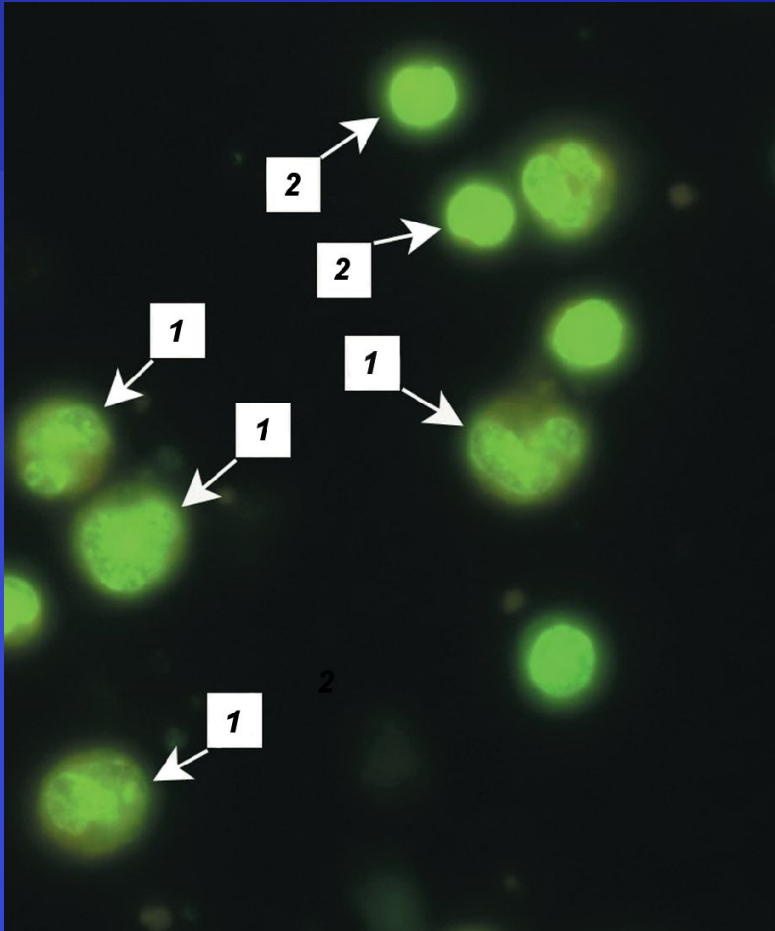


Чистую фракцию нейтрофилов выделяли из 15 мл гепаринизированной периферической венозной крови. Для изучения образования НВЛ полученные таким образом клетки инкубировали 30 мин при 37°С с прогестероном в физиологических концентрациях, соответствующих их уровню в периферической крови в I (20 нг/мл), II (50 нг/мл) и III (100 нг/мл) триместры беременности. Для контроля использовали взвесь нейтрофилов, инкубируемых в тех же условиях, без гормона.



Определяли процент клеток с сегментированным ядром, недифференцированным ядром и НВЛ [5]. Данная классификация условна и характеризует разную степень формирования НВЛ. Клетки с сегментированным ядром – это неизменные клетки, у которых хорошо визуализируется сегментированное ядро. После активации нейтрофила происходит изменение структуры ядра и гранул (ядерная мембрана разрушается, гранулы растворяются, компоненты будущей ловушки распределяются по всему объему клетки) – клетка с недифференцированным ядром. Затем клетка сокращается и выбрасывает высокоактивную смесь наружу, формируя сеть – НВЛ.

MICRO

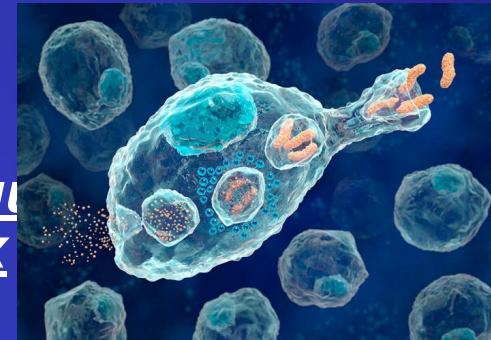


Нативный препарат
обогащенной фракции
моноцитов. Люминесцентная
микроскопия (окрашивание
акридиновым оранжевым; ув.
1000).

1 – моноцит; *2* – лимфоцит.

MICRO

Изучая влияние прогестерона на внутриклеточный кислородзависимый метаболизм нейтрофилов периферической крови с использованием НСТ-теста, мы обнаружили, что прогестерон во всех трех используемых концентрациях приводит к значимому снижению активности и индекса спонтанного НСТ-теста, но не влияет на аналогичные показатели индуцированного НСТ-теста, т. е. интактные нейтрофилы отвечали на воздействие прогестерона снижением их бактерицидной функции, а при дополнительной стимуляции активированные нейтрофилы не изменяли своих свойств. При оценке регулирующего действия прогестерона на фагоцитарную функцию нейтрофилов периферической крови, а именно на активность, интенсивность и фагоцитарное число, не выявили достоверных различий в числе.



MICRO

Фиксированный мазок чистой фракции нейтрофилов, активированных прогестероном в концентрации 50 нг/мл. Люминесцентная микроскопия (окрашивание акридиновым оранжевым; ув. 1000).

Морфологические формы нейтрофилов: 1 – нейтрофил с сегментированным ядром; 2 – нейтрофил с недифференцированным ядром; 3 – нейтрофильная внеклеточная ловушка.

Рис3

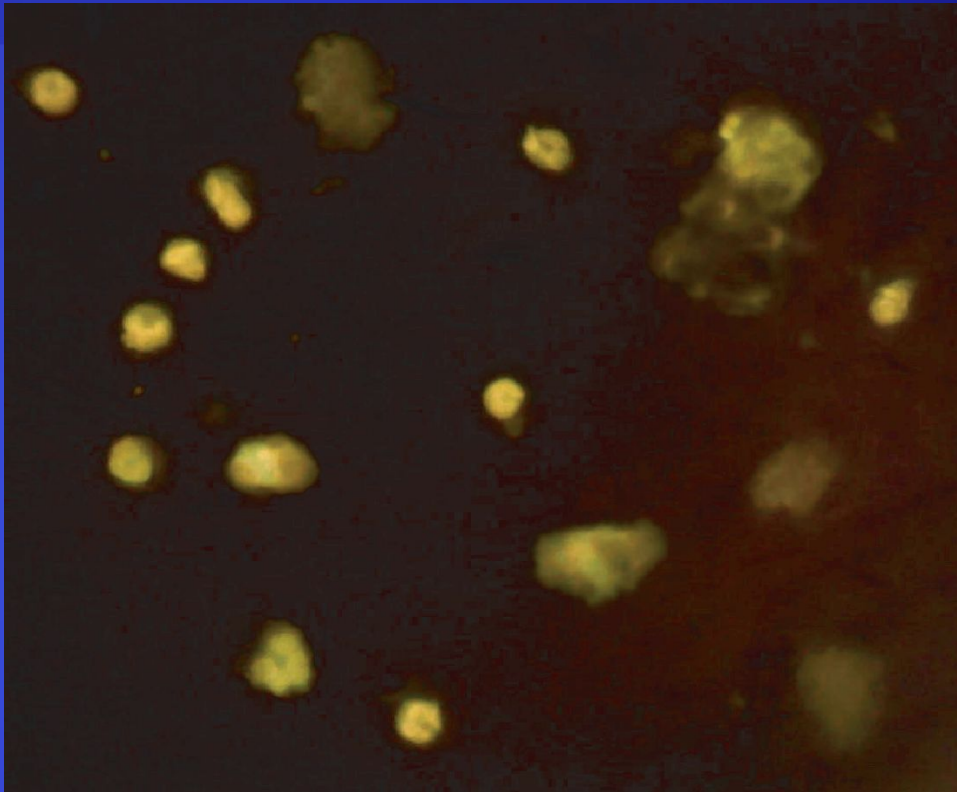


Таблица 3

Влияние прогестерона на способность нейтрофилов периферической крови к образованию ловушек ($M \pm m$) ($n = 15$)

Группа		Морфологические формы нейтрофилов		
		нейтрофилы с сегментированным ядром, %	нейтрофилы с недифференцированным ядром, %	НВЛ, %
1-я	контроль	$58,7 \pm 4,6$	$27,8 \pm 4,2$	$13,3 \pm 1,9$
2-я	прогестерон (20 нг/мл)	$37,7 \pm 5,6$	$42,0 \pm 5,7$	$20,3 \pm 4,2$
		$p_{1-2} = 0,009$		
3-я	прогестерон (50 нг/мл)	$31,9 \pm 5,5$	$41,0 \pm 5,0$	$26,4 \pm 4,3$
		$p_{1-3} = 0,003$		$p_{1-3} = 0,003$
4-я	прогестерон (100 нг/мл)	$35,7 \pm 4,0$	$46,6 \pm 3,0$	$17,7 \pm 2,9$
		$p_{1-4} = 0,001$	$p_{1-4} = 0,0007$	

MICRO

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что прогестерон в концентрациях, соответствующих I, II и III триместрам беременности, приводит к снижению кислородзависимой бактерицидной функции неактивированных нейтрофилов и, к усилению формирования внеклеточных ловушек, максимальное значение которых регистрируется в группе, где концентрация прогестерона соответствует II триместру беременности. Скорее всего, полученные данные в эффектах действия прогестерона на нейтрофилы можно объяснить различием в рецепторном аппарате, обеспечивающем бактерицидную функцию и формирование НВЛ.

MICRO



Рис. 2. Оценка внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови с помощью индуцированного НСТ-теста. Световая микроскопия (окрашивание 0,1% раствором сафранина; ув. 1000).

MICRO

RESULTS



MICRO

Получение данных об оценке мощности защитного ответа нейтрофилов путем фагоцитоза и в результате захвата МПГ в NET`s сделает более понятным механизмы патогенеза ряда болезней и подходы к их эффективному лечению .



MICRO

Проблемные вопросы темы

- Все ли нейтрофилы способны образовывать NET`s?
- дальнейшая судьба внеклеточных структур – фибрилл NET`s с основой из ДНК-гистонов .



**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**