

УДК 616-002-008.953-092

И. А. Новикова, В. С. Ткачева, Ж. В. Зубкова, С. С. Прокопович, Е. М. Кондратенко

Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»
г. Гомель, Республика Беларусь

СОПРЯЖЕННОСТЬ ПАРАМЕТРОВ РАННЕГО И ПОЗДНЕГО НЕТОЗА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Введение

Полиморфноядерные лейкоциты (ПМЛ) играют ключевую роль в реализации реакций врожденного иммунитета. Благодаря различным проявлениям реактивности (хемотаксису, фагоцитозу, продукции активных форм кислорода и др.), ПМЛ не только осуществляют антимикробный эффект, но также участвуют в регуляции иммунных реакций. Относительно недавно описано свойство активированных нейтрофилов формировать во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры (нейтрофильные экстрацеллюлярные сети, или neutrophil extracellular traps, NET), которые способны улавливать и уничтожать различные микроорганизмы [1]. Формирование NET – один из вариантов активной клеточной смерти, но значительно отличается от апоптоза и некроза по морфологическим и молекулярным критериям. Клеточная смерть, возникающая в процессе формирования NET, является важнейшим механизмом врожденного иммунного ответа. NET представляют собой сложную структуру, состоящую из хроматина ядра, различных протеинов гранул, гистонов, катионных антимикробных пептидов и других протеинов, таких как протеазы. На сегодняшний день описаны два основных механизма нетоза. Суицидальный (поздний) нетоз реализуется через 120–140 мин с момента активации клетки, зависит от наработки высокореактивных форм кислорода через активацию NADPH-оксидазы. Далее посредством нейтрофильной эластазы (NE) и протеин-аргинин-дезаминазы (PAD4) происходят гидролиз мембран азуром, а также гистонов ядра и деконденсация хроматина. На завершающей стадии процесса в цитоплазматической мембране образуются поры, через которые расформированный хроматин выбрасывается во внеклеточное пространство. В результате данного процесса происходит иммобилизация и разрушение клетки. Витальный (ранний) нетоз реализуется в течение 5–60 мин, обычно не сопровождается активацией NADPH-оксидазы и разрушением клеточной мембраны. В этом случае хроматин высвобождается через ядерные выпячивания или везикулярный транспорт, что сохраняет целостность клетки. Энуклеированные нейтрофилы превращаются в цитопласты, которые некоторое время сохраняют способность к хемотаксису и фагоцитозу [2].

В последние годы накоплены данные о возможной роли нетоза в развитии широкого спектра заболеваний. С одной стороны, NETs могут рассматриваться как фактор защиты от инфекций, дополняя бактерицидные свойства АФК, продуцируемых нейтрофилами. При этом активация образования внеклеточных сетей происходит параллельно с повышением АФК-продуцирующих свойств нейтрофилов. С другой стороны, описана активация нетоза без увеличения АФК-продукции, которая может носить деструктивный характер в связи с отсутствием биологической целесообразности. В этом случае внеклеточно расположенные ферменты способны вызывать деструкцию клеточных мембран, а свободно лежащие нити ДНК – индуцировать аутоиммунные расстройства.

При изучении способности нейтрофилов к формированию сетей большинство исследователей оценивают суицидальный нетоз. В то же время именно витальный нетоз считается ведущим в ответе на микроорганизмы. Какие из параметров нетоза наиболее информативны при различных заболеваниях – остается неясным.

Цель

Оценка сопряженности параметров раннего и позднего нетоза у пациентов с заболеваниями различной этиологии.

Материал и методы исследования

В исследование включены 153 пациента в возрасте от 20 до 51 года с заболеваниями различной этиологии (54 человека с рецидивирующими инфекционно-воспалительными заболеваниями дыхательных путей, 30 пациентов – с хронической болезнью почек (ХБП) 4 стадии, 46 пациентов с селективным дефицитом IgA, 23 пациента с системными аутоиммунными заболеваниями (ревматоидным артритом, системной красной волчанкой). Контрольную группу составили 100 практически здоровых пациентов, сопоставимых по полу и возрасту.

Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные из гепаринизированной венозной крови (10 ЕД/мл) путем отстаивания при 37°C в течение 45 мин. Количество нейтрофилов в рабочей суспензии составляло 5×10^6 клеток/мл. Формирование NETs учитывали по методике И. И. Долгушина в нашей модификации [3]. Для оценки раннего нетоза клетки инкубировали в течение 30 мин, а позднего нетоза – в течение 150 мин при 37°C в питательной среде с фосфатно-солевым буфером (pH=7,2) без стимулятора (спонтанный уровень NETs30сп, NETs150сп) и в присутствии активатора (стимулированный уровень NETs30ст, NETs150ст). Изготавливали мазки на предметных стеклах, окрашивали по Романовскому – Гимзе с последующей микроскопией под иммерсионным увеличением. Подсчитывали количество NETs на 200 нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (Q025 – Q075). Корреляционный анализ проводили с использованием ранговой корреляции Спирмена (rs). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями и ХБП в целом отмечалось повышение параметров нетоза относительно контрольной группы. Так, повышенные значения NET отмечались у 57 (68%) человек из 85 обследованных. Но у 17 (20%) пациентов показатели не отличались от нормы, а у 11 (12%) – количество NET было ниже значений контрольной группы. В большинстве случаев (60%) показатели нетоза повышались одновременно при краткосрочном культивировании (30 мин) и при более длительной инкубации (150 мин). Только в 19% случаев у 16 пациентов наблюдалось изолированное повышение NET при инкубации 30 мин и в 21% у 18 обследованных – при 150-минутной инкубации.

При сравнении NET-образующей способности в спонтанном и стимулированном тесте у большинства пациентов (70 человек, 83% случаев) были повышены оба параметра ($\chi^2=5,78$; $p<0,001$), тогда как повышение только NETсп отмечалось у 9 пациентов, в 10% случаев, а NETст – у 5 человек, в 6% случаев. Полученные данные свидетельствуют, что активация витального нетоза у большинства пациентов сопровождалась активацией суицидального.

Результаты подтверждены наличием корреляций между показателями раннего и позднего нетоза. Так, у пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями имелась значимая корреляция NET30 ↔ NET150 ($r_s=0,37$; $p=0,005$ в спонтанном тесте; $r_s=0,47$; $p<0,001$ – в стимулированном тесте). У пациентов с ХБП взаимосвязь витального и суицидального нетоза оказалась более выраженной (NET30 ↔ NET150, $r_s=0,90$; $p<0,001$ в культурах клеток без стимулятора; $r_s=0,81$; $p<0,001$ при стимуляции), а также NETсп ↔ NETст ($r_s=0,96$; $p<0,001$; $r_s=0,83$; $p<0,001$).

У пациентов с селективным дефицитом IgA повышение способности к нетозу выявлялось в 78,3% случаев ($n=36$, $\chi^2=6,39$; $p<0,001$). При этом частота встречаемости повышенных параметров витального нетоза в целом была сопоставима с частотой случаев повышения суицидального нетоза (67,4 и 50,0%; 58,7 и 50,0% соответственно). В то же время степень увеличения количества NET оказалась значительно выше в тестах витального нетоза (в 10 раз для спонтанного теста, в 5 раз для стимулированного), тогда как в 150-минутных культурах (суицидальный нетоз) не превышала 1,5 раза. Сопряженность между параметрами раннего и позднего нетоза отмечалась только по спонтанному тесту (NET30 ↔ NET150, $r_s=0,53$; $p<0,0004$), тогда как по стимулированному тесту была статистически не значимой.

У пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями во всех случаях наблюдалось повышение параметров нетоза относительно контрольной группы, но корреляций между параметрами раннего и позднего нетоза не обнаружено.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. У пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями дыхательной системы, хронической болезнью почек, селективным дефицитом IgA, системными аутоиммунными заболеваниями повышена нетотическая активность лейкоцитов крови.
2. Вектор изменения показателей раннего (витального) и позднего (суицидального) нетоза у обследованных пациентов в большинстве случаев совпадает, однако степень изменения различается. У пациентов с селективным дефицитом IgA в максимальной степени повышены параметры витального нетоза.
3. Сопряженность параметров витального и суицидального нетоза по-разному представлена у пациентов в зависимости от характера патологического процесса, что указывает на целесообразность одновременной оценки раннего и позднего нетоза для характеристики функционального статуса нейтрофилов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / M. Brinkmann [et al.] // Science. – 2004. – Т. 303, № 5663. – С. 1532–1535.
2. Воробьева, Н. В. Нетоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии / Н. В. Воробьева, Б. В. Черняк // Биохимия. – 2020. – Т. 85, вып. 10. – С. 1383–1397.
3. Железко, В. В. Функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с ревматоидным артритом / В. В. Железко, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 3 (45). – С. 50–54.