

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛОВ
ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ВАСКУЛИТЕ**

Железко В. В.

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

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) играют важную роль в развитии и течении многих иммунокомплексных заболеваний, в том числе геморрагическом васкулите (ГВ) [1]. Научные достижения последних лет показали, что одним из перспективных маркеров, характеризующих функциональную активность нейтрофилов, является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) [2], которым отводится одна из главных ролей в развитии и течении аутоиммунного воспаления. В то же время исследования по изучению процессов NET-образования в совокупности с другими тестами оценки функциональной активности нейтрофилов крайне малочисленны.

Цель

Оценить функциональный статус нейтрофилов у пациентов с геморрагическим васкулитом.

Материал и методы исследования

Обследовано 12 пациентов с геморрагическим васкулитом (критерии ACR/EULAR 2010 г.) в возрасте от 18 до 47 лет. Кожная форма ГВ диагностирована у 9 пациентов, кожно-суставная — у 3 пациентов. Первая степень активности ГВ отмечалась у 6 обследованных, вторая — у 3, третья — у 3. У 5 пациентов с ГВ отмечалось острое течение заболевания, у 7 — рецидивирующее. Кроме общепринятого обследования проведена оценка функциональной активности нейтрофилов крови. Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные путем отстаивания гепаринизированной венозной крови (10 Ед/мл) в течение 45 мин при 37 °С. Количество НГ в лейкоцитарной суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4). Жизнеспособность нейтрофилов в тесте исключения трипанового синего составляла не менее 95 %. В оценку функционального статуса включали: кислород-продуцирующую активность НГ в спонтанном и стимулированном *S. aureus* тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ_{сп} и НСТ_{ст} соответственно); поглотительную активность в реакции фагоцитоза *S. aureus* (10^8 КОЕ/мл) с расчетом фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ); образование нейтрофильных внеклеточных ловушек по методу И. И. Долгушина (2010) в нашей модификации [3]; спонтанную и стимулированную нитроксид-продуцирующую активность НГ по накоплению 3-нитротирозина в плазме (3-NT_{сп} и 3-NT_{ст} соответственно) [4]. Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц, не имеющих клинико-лабораторных признаков иммунологической недостаточности.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов, результаты выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (25; 75 %). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Комплексная оценка функционального статуса нейтрофилов у пациентов с ГВ представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Параметры функционального статуса нейтрофилов у пациентов с ГВ

Параметр	Доноры (n = 15)	Пациенты с ГВ (n = 12)
НСТ _{сп} , %	12 (10; 16)	15 (11; 22)
НСТ _{ст} , %	49 (44; 56)	49,5 (43; 0,54)
ИРР	0,76 (0,69; 0,8)	0,73 (0,6; 0,8)
ФИ, %	69 (64; 76)	66 (50,5; 71)
ФЧ	7 (7,0; 8)	6,5 (5,5; 7)
NET _{сп} , %	2 (2; 3)	8 (5; 12)*
NET _{ст} , %	4 (3; 5)	10,5 (7,5; 15)*
ФР _{NET}	0,4 (0,33; 0,57)	0,3 (0,2; 0,3)*
3-NT _{сп} , (мМ/л) ⁻¹	18,7 (15,7; 20,7)	22,3 (11,9; 29,2)
3-NT _{ст} , (мМ/л) ⁻¹	24,4 (22,1; 27,7)	17,9 (10,1; 25,5)*
ФР _{3-NT}	1,3 (1,2; 1,4)	0,8 (0,7; 1)*

Примечание: * — Различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с группой здоровых лиц, ИРР = $(\text{НСТ}_{\text{ст}} - \text{НСТ}_{\text{сп}}) / \text{НСТ}_{\text{ст}}$; $\text{ФР}_{\text{NET}} = (\text{NET}_{\text{ст}} - \text{NET}_{\text{сп}}) / \text{NET}_{\text{ст}}$; $\text{ФР}_{3\text{-NT}} = 3\text{-NT}_{\text{ст}} / 3\text{-NT}_{\text{сп}}$.

Как видно из таблицы 1, кислород-продуцирующая (НСТ_{сп}, НСТ_{ст}, ИРР) и поглотительная активность НГ (ФИ, ФЧ) у пациентов с ГВ значимо не отличалась от контрольной группы. В то же время способность к образованию нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей была повышена как в спонтанном, так и в стимулированном тесте (NET_{сп} и NET_{ст} $p < 0,01$ и $p < 0,01$ соответственно) с одновременным понижением значений ФР_{NET} ($p = 0,008$), по сравнению со здоровыми лицами. Нитроксид-продуцирующая активность нейтрофилов у обследованных пациентов в спонтанном тесте (3-NT_{сп}) значимо не отличалась от контрольной группы, тогда как уровень продукции NO в ответ на стимуляцию (3-NT_{ст}) и ФР_{3-NT} у пациентов оказались значимо ниже здоровых лиц ($p = 0,046$ и $p < 0,01$ соответственно).

Выявлены взаимосвязи обратного характера умеренной силы между NET_{сп} и ФИ ($r_s = -0,4$, $p = 0,02$) с одной стороны и NET_{сп} и ИРР ($r_s = -0,6$, $p = 0,042$) — с другой. Из литературных источников известно, что NET-образование при кратковременной инкубации лейкоцитов в культуральной среде не связано с активацией NADPH-оксидазного механизма, который обеспечивает кислород-зависимые процессы (например, НСТ-тест). Поэтому полученный результат можно рассматривать как дополнительное подтверждение альтернативного характера нетоза как дополнительного механизма реализации бактерицидного потенциала НГ. [2].

Интересно отметить наличие значимой взаимосвязи между способностью к высвобождению нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET_{ст}) и их нитроксид-продуцирующей активностью (3-NT_{ст}) ($r = -0,6$, $p = 0,049$). Наши исследования показывают возможность реализации процессов, связанных с NO-продукцией, через гибель нейтрофилов путем нетоза. Поэтому наличие отрицательной взаимосвязи умеренной силы логично, учитывая тот факт, что образование NET рассматривается как один из способов клеточной гибели [2].

Выводы

1. Выявлены комплексные изменения функциональных свойств нейтрофилов у пациентов с геморрагическим васкулитом в виде снижения нитроксид-продуцирующей (3-NT_{ст}, ФР_{3-NT}) активности на фоне увеличения способности к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET_{сп}; NET_{ст}; ФР_{NET}).

2. У пациентов с ГВ обнаружено наличие обратной взаимосвязи между NET-образующей способностью с одной стороны, поглотительной, кислород-продуцирующей и NO-синтезирующей активностью НГ с другой.

ЛИТЕРАТУРА

1. New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura) / M. H. Heineke [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. — 2017. — Vol. 16, Is. 12. — P. 1246–1253.
2. Gabriela Camicia. Neutrophil extracellular traps in sepsis / Camicia Gabriela, Roberto Pozner, Gabriela de Larranaga // *Shock*. — 2014. — Vol. 42, № 4. — P. 286–294.
3. Метод диагностики нарушений фагоцитарного звена иммунитета по оценке потенциальной бактерицидной активности нейтрофилов: инструкция по применению: утв. 18.06.2015, № 106-1014 / И. А. Новикова, В. В. Железко; М-во здравоохранения Республики Беларусь, Гомельский государственный медицинский университет. — Гомель, 2014. — 9 с.
4. Crow, J. P. Manganese and iron porphyrins catalyze peroxynitrite decomposition and simultaneously increase nitration and oxidant yield: implications for their use as peroxynitrite scavengers in vivo / J. P. Crow // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1999. — № 371. — P. 41–52.