

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКОЙ ПУРПУРОЙ

Зубкова Ж. В.

Научный руководитель: д.м.н., профессор *И. А. Новикова*

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

Введение

Одним из ведущих звеньев в патогенезе иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП) является нарушение в системе микроциркуляции [1]. Известно, что основная роль в поддержании процессов нормального состояния кровообращения в микроциркуляторном русле принадлежит тромбоцитам и нейтрофильным гранулоцитам (НГ) [2].

Цель

Оценить проявления функциональной активности нейтрофилов крови у пациентов с ИТП.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 11 пациентов с ИТП в возрасте от 25 до 50 лет. Контрольную группу составили 15 клинически здоровых доноров сопоставимых по полу и возрасту.

Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные из гепаринизированной крови путем отстаивания в течение 45 мин. при 37 °С. Оценивали поглотительную активность НГ в реакции фагоцитоза *S. aureus* инактивированного нагреванием (штамм АТСС 25923, количество микробных тел — 10⁸ КОЕ/мл). Подсчитывали процент НГ, поглотивших микробные частицы — фагоцитарный индекс (ФИ); среднее число фагоцитированных объектов на один нейтрофил — фагоцитарное число (ФЧ). Продукцию нейтрофилами активных форм кислорода определяли в реакции восстановления нитросинеготетразолия в спонтанном (НСТ сп) и стимулированном инактивированным *S. aureus* (НСТ ст) вариантах с микроскопической оценкой результата. Результат выражали как процент содержания формазан-положительных клеток на 100 сосчитанных лейкоцитов.

Способность НГ к образованию внеклеточных ловушек определяли по методу И. И. Долгушина и соавт. в нашей модификации [3]. Лейкоциты инкубировали в течение 30 мин. при 37 °С без стимулятора (спонтанный уровень, NET сп) и в присутствии *S. aureus* (стимулированный тест — NET ст). Учитывали четко определяемые нейтрофильные сети, подсчитывая не менее 200 нейтрофилов. Результат выражали как относительное количество внеклеточных ловушек на 100 сосчитанных лейкоцитов.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов: критерий U Манна — Уитни, корреляционный анализ. Результаты выражали в виде Me (25 %; 75 %), где Me — медиана, 25 % — нижний квартиль, 75 % — верхний квартиль. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты оценки функциональных свойств нейтрофилов у пациентов с ИТП представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели функционального статуса НГ у пациентов с ИТП и здоровых лиц

Показатель, ед. изм.	Здоровые лица (n = 15)	Пациенты с ИТП (n = 11)
НСТсп, %	12,0 (9,0; 13,0)	10,0 (5,0; 18,0)
НСТст, %	50,0 (46,0; 53,0)	50,0 (40,0; 55,0)
NETсп, %	2,0 (2,0; 3,0)	16,0 (3,0; 33,0)*
NETст, %	5,0 (4,5; 6,0)	18,0 (15,0; 28,0)*
ФИ, %	73,0 (68,0; 78,0)	72,0 (64,0; 79,0)
ФЧ	8,0 (7,0; 8,0)	7,0 (6,5; 8,0)

* Различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с группой здоровых лиц.

Из данных таблицы 1 видно, что у пациентов с ИТП параметры кислород-продуцирующей активности НГ (как в спонтанном, так и в стимулированном НСТ-тестах) не изменялись по сравнению со здоровыми лицами. Также не наблюдалось изменения поглотительной активности НГ (показатели ФИ, ФЧ).

В то же время отмечалось увеличение количества внеклеточных ловушек в 8 раз в спонтанном (NET сп) и в 3,6 раза в стимулированном *S. aureus* (NET ст) вариантах тестов относительно контрольной группы ($p = 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно). При этом взаимосвязи между процессами кислородпродуцирующей активности НГ и их способностью к формированию NET не было обнаружено.

Нейтрофильные внеклеточные ловушки являются одним из способов реализации нейтрофилами бактерицидного потенциала. По данным различных исследований известно, что количество сетей повышается при ряде патологий как инфекционной так и неинфекционной природы [4, 5]. Описанное нами значительное увеличение количества NET в сравнении со здоровыми лицами может быть связано с наличием в крови пациентов с ИТП веществ, стимулирующих процесс высвобождения нейтрофильных ловушек. Возможно, непосредственно сетеподобные структуры могут выступать дополнительными факторами агрессии, вызывая окклюзию мелких сосудов, что в свою очередь может приводить к усугублению патологических процессов в системе микроциркуляции при ИТП.

Выводы

1. У пациентов с ИТП поглотительная (фагоцитоз *S. aureus*) и кислородпродуцирующая (НСТ-тест) активность нейтрофилов крови не изменена.
2. Выявлено значительное усиление спонтанной и стимулированной (NETсп, NETст) способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек у пациентов с ИТП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cooper, N. The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura / N. Cooper, J. Bussel // British Journal of Haematology. — 2006. — Vol. 133. — P. 364–374.
2. Human Blood Platelets, PMN Leukocytes and Their Interactions *in vitro*. Responses to Selective and Non-selective Stimuli / K. Drábiková [et al.] // Gen. Physiol. Biophys. — 2000. — Vol. 19. — P. 393–404.
3. Железко, В. В. Способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек в различных модельных системах / В. В. Железко, О. Ю. Слышова // Материалы Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины — 2014», Гомель, 23–24 апреля 2014 г. / Гомельский гос. мед. университет; редкол.: А. Н. Лыжиков [и др.]. — Гомель, 2014. — Т. 1. — С. 142–143.
4. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury / A. Caudrillier [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. — 2012. — Vol. 122. — P. 2661–2671.
5. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood / S. R. Clark [et al.] // Nature medicine. — 2007. — Vol. 13. — P. 463–469.

УДК 612.111.7:612.112.91]:616-071/-074

МЕТОД ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛАМИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ

Зубкова Ж. В.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время активно изучаются аспекты взаимодействия лейкоцитов с тромбоцитами. Известны методы исследования влияния тромбоцитов на функции нейтрофилов, в том числе на их способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NET), в культурах *in vitro* с люминесцентной микроскопией, а также в экспериментальных моделях на животных [1]. Однако эти методы не доступны большинству клинических лабораторий в силу своей сложности, трудоемкости и необходимости дорогостоящего оборудования. Разработка более приемлемых методических подходов к изучению влияния тромбоцитов на способность нейтрофилов к формированию NET расширит возможности их исследования.