

УДК 616.155.34:616-091.818]-005.6:616.72-002.77-052

**Ж. В. Зубкова, И. А. Новикова, М. В. Пак***Учреждение образования**«Гомельский государственный медицинский университет»**г. Гомель, Республика Беларусь*

## **ТРОМБОЦИТ-АССОЦИИРОВАННЫЙ НЕТОЗ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

### ***Введение***

Нетоз представляет собой процесс высвобождения активированными нейтрофилами во внеклеточное пространство сетеподобных структур, состоящих из деконденсированных волокон хроматина, цитоплазматических, гранулярных и ядерных элементов. Они получили название нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (neutrophil extracellular traps, NETs). Их разрушение и выведение из организма осуществляется посредством ферментативного расщепления, в частности, с участием ДНК-азы.

По данным ряда исследователей нарушение клиренса нейтрофильных сетей или их повышенное образование может поддерживать активность воспалительного процесса при ревматоидном артрите (РА) [1]. Так, некоторые компоненты NETs (миелопероксидаза, гистоны) могут вызывать микротромбоз сосудов различных органов, связываясь с отрицательно заряженными мембранами клеток, вызывая их перфорацию и, как следствие, лизис клеток с последующим развитием воспалительной реакции [2].

За последние годы широко изучена способность тромбоцитов оказывать влияние на процесс формирования нейтрофильных ловушек. Выделяют несколько механизмов нетоза, ассоциированного с тромбоцитами. Важнейшая роль отводится взаимодействиям между тромбоцитами и нейтрофильными гранулоцитами, опосредованным рецепторами (TLR4, CD40, CD18 ↔ GPIb). Возможно также участие гуморального механизма, реализуемого через высвобождение широкого спектра биологически активных веществ (RANTES, PF4,  $\beta$ -дефензин 1 и др.) [3].

Изучение тромбоцит-ассоциированного нетоза при РА имеет большое значение для расширения представлений о механизмах развития заболевания и открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и контроля данного заболевания.

### ***Цель***

Оценить влияние тромбоцитов на нетоз у пациентов с ревматоидным артритом.

### ***Материалы и методы исследования***

В исследование включены 49 пациентов с установленным диагнозом ревматоидный артрит (РА) (критерии ACR/EULAR 2010 г.) в возрасте от 20 до 50 лет, с I–III степенями активности согласно индексу DAS28.

Контрольную группу составили 65 клинически здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту, которые на момент исследования не имели клинико-лабораторных признаков тяжелой сопутствующей патологии.

Для оценки влияния тромбоцитов на NET-образующую функцию нейтрофилов нами была разработана тест-система, основанная на совместном культивировании лейкоцитов с тромбоцитами [4]. Полученную путем отстаивания периферической венозной крови лейкоцитарную суспензию смешивали с равным объемом обогащенной тромбоцитами плазмы без активации *in vitro* (тест-система Le+Тринт), либо с обога-

## СЕКЦИЯ

### Клиническая лабораторная диагностика. Иммунология. Аллергология

щенной тромбоцитами плазмой совместно с активатором тромбоцитов (АДФ 2,5 мкг/мл раствор) (тест-система Le+Тракт). Контролем служила лейкоцитарная суспензия, смешанная с равным объемом бедной тромбоцитами плазмы (тест-система Le+Пл). Клеточные культуры инкубировали в течение 30 или 150 минут при 37 °С. Готовили мазки, окрашивали по Романовскому–Гимзе и микроскопировали. Подсчет NETs осуществляли на 200 сосчитанных нейтрофилов. Результат выражали в процентах.

Агрегационные свойства тромбоцитов оценивали турбидиметрическим методом на фотооптическом агрегометре «СОЛАР» AP2110. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл.

Статистический анализ проводился при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) с использованием непараметрических методов: критерий U Манна–Уитни, корреляционный анализ Спирмена. Результат выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q0,25–Q0,75). Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В настоящее время известно, что процесс реализации NETs может протекать с вовлечением различных механизмов. Активный процесс, протекающий с активацией NADPH-оксидазы, сопровождающийся деконденсацией хроматина, последующим распадом ядерной мембраны и лизисом нейтрофила занимает 3–4 часа и называется «суицидальный» нетоз. С другой стороны, имеется «витальный» тип нетоза, который не сопровождается разрушением ядерной мембраны и лизисом клетки. Он реализуется в течение 5–60 минут и является относительно независимым от NADPH-оксидазы. В связи с этим, в известных тест-системах, для оценки различных типов нетоза используется время инкубации 30 минут и 150 минут для «витального» и «суицидального» типов NET-образования соответственно. В нашем исследовании для оценки влияния тромбоцитов на различные виды нетоза у пациентов с РА мы также использовали данное время инкубации. Данные представлены на таблице 1.

Таблица 1 – Тромбоцит-ассоциированный нетоз у пациентов с РА.

Тест-система	Контрольная группа	РА
Le+Пл («витальный» нетоз)	3 (2; 5)	5 (3; 7)*/**
Le+Пл 150 («суицидальный» нетоз)	4 (3; 6)	9 (5; 11)*/**
Le+Тринт («витальный» нетоз)	2 (1; 3)	3 (2; 5)*
Le+Тринт («суицидальный» нетоз)	4 (2; 5)	7 (4; 10)*
Le+Тракт («витальный» нетоз)	2 (2; 4)	5 (3; 7)*/**
Le+Тракт («суицидальный» нетоз)	3 (2; 5)	10 (7; 15)*/**

*Примечание – Данные представлены в виде Me (25%; 75.); \* — различия значимы ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контрольной группой; \*\* — различия значимы ( $p < 0,05$ ) в сравнении с тест-системой Le+Тринт*

Как видно из таблицы 1, количество NETs у пациентов с РА превышало значения контрольной группы, как для «витального», так и для «суицидального» типов нетоза во всех тест-системах ( $p \leq 0,05$ ).

Далее мы оценили влияние интактных и активированных тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в изучаемой группе пациентов. Установлено, что не активированные *in vitro* тромбоциты оказывают угнетающее влияние на

## СЕКЦИЯ

### Клиническая лабораторная диагностика. Иммунология. Аллергология

нетоз при краткосрочной и длительной инкубации ( $p=0,008$  и  $p=0,02$  соответственно). Активация тромбоцитов раствором АДФ приводила к увеличению количества NETs в сравнении с тест-системой Le+Тринт ( $p=0,004$  и  $p=0,005$  для 30- и 150-минутной инкубации соответственно). При этом, уровень NETs в тест-системе Le+Тракт соответствовал уровню сетей в культуре Le+Пл ( $p=0,9$  и  $p=0,23$  соответственно в тестах для оценки «витального» и «суицидального» типов нетоза).

При изучении взаимосвязей между способностью нейтрофилов к формированию экстрацеллюлярных сетей и количественными и функциональными показателями тромбоцитов установлены значимые корреляции параметров «витального» нетоза в тест-системах Le+Пл и Le+Тринт с количеством тромбоцитов ( $p=0,008$ ;  $r=0,37$  и  $p=0,02$ ;  $r=0,32$  соответственно). Также выявлены взаимосвязи между количеством NETs в тестах оценки как «витального», так и «суицидального» нетоза Le+Пл и Le+Тринт с показателем активности тромбоцитов (максимальная степень агрегации тромбоцитов) ( $p=0,009$ ;  $r=0,38$  и  $p=0,00002$ ;  $r=0,58$  для «витального» типа нетоза;  $p=0,03$ ;  $r=0,32$  и  $p=0,007$ ;  $r=0,39$  для «суицидального» типа нетоза соответственно).

Таким образом, у пациентов с РА очевидна связь тромбоцитов с процессом формирования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей.

#### **Заключение**

1. У пациентов с РА, в отличие от здоровых лиц, установлено повышение NET-образующей способности нейтрофилов ( $p \leq 0,05$ ).

2. Интактные тромбоциты оказывают угнетающее действие на нетоз ( $p=0,008$  и  $p=0,02$  для «витального» и «суицидального» типов нетоза соответственно), при этом активированные тромбоциты отменяют это действие (Le+Тринт vs Le+Тракт:  $p=0,004$  и  $p=0,005$ ; Le+Тракт vs Le+Пл:  $p=0,9$  и  $p=0,23$ ).

3. Выявлены положительные корреляционные взаимосвязи показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза и количества тромбоцитов для тест-систем Le+Пл и Le+Тринт при оценке «витального» нетоза ( $r=0,37$ ;  $p=0,008$  и  $r=0,32$ ;  $p=0,02$  соответственно), а также с максимальной степенью агрегации тромбоцитов как для «витального», так и для «суицидального» типов нетоза в тест-системах Le+Пл и Le+Тринт ( $r=0,32-0,58$ ;  $p \leq 0,05$ ).

#### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Liew, P. X. The neutrophil's role during health and disease / P. X. Liew, P. Kubes // *Physiol Rev.* – 2019. – Vol. 99, № 2. – P. 223–248. doi: 10.1152/physrev.00012.2018.
2. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death / Silvestre-Roig C [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 569, № 7755. – P. 236–240. doi: 10.1038/s41586-019-1167-6.
3. Wienkamp, A-K. Platelets in the NETworks interweaving inflammation and thrombosis / A.-K. Wienkamp, L. Erpenbeck, J. Rossaint // *Front. Immunol.* – 2022. – Art. 13:953129. doi: 10.3389/fimmu.2022.953129.
4. Зубкова, Ж. В. Метод оценки влияния тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей / Ж. В. Зубкова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. статей VIII Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых, Гомель, 28 апр. 2016 г. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол. : А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2016. – С. 269-271.