

3. Новик, В. И. О методах окраски цитологических препаратов / В. И. Новик // Новости клинической цитологии России. – 2017. – № 1 (21). – С. 9.

4. Ильина, Т. Е. Прогностическая оценка уровня экспрессии микроРНК и количества областей нуклеолярных организаторов при фолликулярной опухоли щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала / Т. Е. Ильина, Е. Л. Казачков // Уральский медицинский журнал. – 2023. – № 22 (2). – С. 75–83. doi: 10.52420/2071-5943-2023-22-2-74-83.

5. Гуцин, Я. А. Применение дополнительных гистологических методов окраски в доклинических исследованиях / Я. А. Гуцин // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – № 4. doi: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-07>

УДК 616.155.294-091.818:616.5-002.525.2]-097-002-074

*Ж. В. Зубкова, И. А. Новикова, К. С. Макеева, Г. Р. Ермолицкая*

**Учреждение образования**

**«Гомельский государственный медицинский университет»**

**г. Гомель, Республика Беларусь**

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ ТРОМБОЦИТ-АССОЦИИРОВАННОГО НЕТОЗА С ЛАБОРАТОРНЫМИ МАРКЕРАМИ АУТОИММУНИЗАЦИИ И ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ**

### ***Введение***

Системная красная волчанка (СКВ) – системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся выраженной гетерогенностью в отношении этиологии, предрасполагающих факторов, механизмов патогенеза и клинических проявлений [1]. Основу патогенеза СКВ составляет продукция антител к собственным тканям организма с образованием иммунных комплексов, которые повреждают эндотелий сосудов, что приводит к развитию системного воспаления [2]. Высвобождаемые поврежденными эндотелиальными клетками триггерные факторы могут опосредовать активацию тромбоцитов, индуцировать и поддерживать воспалительный процесс [3]. В частности, известно, что тромбоциты посредством прямых контактных взаимодействий и секреции биологически активных веществ способны стимулировать образование нейтрофилами внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs), участвующих в развитии аутоиммунного воспаления при СКВ [4]. В связи с этим изучение взаимосвязей ассоциированного с тромбоцитами нетоза с маркерами аутоиммунных и воспалительных процессов у пациентов с СКВ представляется актуальным.

### ***Цель***

Изучить показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза и их взаимосвязь с маркерами аутоиммунизации и воспаления у пациентов с системной красной волчанкой.

### ***Материал и методы исследования***

В исследование включены 29 пациентов с системной красной волчанкой (28 женщин и 1 мужчина) в возрасте от 23 до 53 лет. Диагноз был установлен на основании классификационных диагностических критериев (ACR, 1997). Длительность анамнеза варьировала от 3 мес. до 25 лет. Клиническая активность оценивалась в баллах по индексам SLEDAI2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, 1992). Минимальная степень активности определена у 12 (41%), умеренная – у 10 (34%) и высокая – у 7 (25%) обследуемых. Все пациенты проходили лечение в ревматологическом отделении У «Гомельская областная клиническая больница» и были обследованы в день поступления в стационар. Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц.

Образование NETs лейкоцитами исследовалось по методу И. И. Долгушина и соавторов [5] в нашей модификации. Изучение базального тромбоцит-ассоциированного нетоза (P-NET<sub>баз</sub>) осуществляли в аутологичных смешанных культурах, состоящих из лейкоцитарной суспензии ( $5 \times 10^6$  кл/мл), и равного объема обогащенной тромбоцитами плазмы с концентрацией тромбоцитов  $200 \times 10^9$  кл/л. Стимулированный тромбоцит-ассоциированный нетоз (P-NET<sub>ст</sub>) оценивали в клеточных культурах лейкоцитов с активированными аденозиндифосфатом (АДФ) (раствор 2,5 мкг/мл) тромбоцитами. Культуры инкубировали в течение 30 мин (для оценки раннего нетоза) или 150 мин (для оценки позднего нетоза) при 37°C. Готовили мазки, окрашивали по Романовскому – Гимзе и микроскопировали. Подсчет NETs осуществляли на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов: критерия U Манн – Уитни, коэффициента корреляции Спирмена. Результат выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (25%; 75%). Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

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

Результаты оценки параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с СКВ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с СКВ

Тест-система		Контрольная группа (n=65)	СКВ (n=31)
Клеточная культура	Время инкубации, мин		
NET-P <sub>баз</sub>	30 (ранний нетоз)	2 (1;3)	4 (2;7)*
	150 (поздний нетоз)	4 (2;5)	8 (4;12)*
NET-P <sub>ст</sub>	30 (ранний нетоз)	2 (2;4)	7 (5;9)*
	150 (поздний нетоз)	3 (2;5)	10 (7;14)*

**Примечание.** Данные представлены в виде Me (25%; 75%).

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

Из таблицы 1 видно, что показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с СКВ выше значений контрольной группы. Уровень базального нетоза в 2 раза превышал значения здоровых лиц в тестах раннего и позднего нетоза ( $p=0,00003$  и  $p=0,00002$  соответственно). Уровень стимулированного нетоза у пациентов с СКВ был в 3,5 раза и 3,3 раза выше значений здоровых лиц ( $p=0,000001$  и  $p=0,000001$  для раннего и позднего нетоза соответственно).

При проведении индивидуального анализа характера изменений изучаемых параметров установлено, что повышение показателей базального (NET-P<sub>баз</sub>) нетоза относительно референтных значений наблюдалось более чем у половины пациентов (референтными значениями считали показатели интерквартильного интервала контрольной группы). У 51,7% пациентов уровень раннего NET-P<sub>баз</sub> был повышен в сравнении с референтными значениями ( $\chi^2=12,14$ ;  $p=0,0005$ ). Показатели позднего базального нетоза (NET-P<sub>баз</sub>) увеличены у 65,5% пациентов ( $\chi^2=15,64$ ;  $p=0,0001$ ). Параметры стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P<sub>ст</sub>) у большинства пациентов с СКВ также превышали референтные значения. Уровень NETs в раннем тесте был повышен у 86,2% пациентов ( $\chi^2=40,47$ ;  $p < 0,0001$ ). В позднем тесте 96,6% пациентов

имели повышенные значения исследуемого параметра относительно референтного интервала ( $\chi^2=47,78$ ;  $p<0,0001$ ).

Значения параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза у обследованных пациентов были ассоциированы с маркерами воспаления (СОЭ, СРБ, фибриноген). Отмечались прямые корреляции показателей базального нетоза (NET-P<sub>баз</sub>) с уровнями СОЭ и СРБ (ранний NET-P<sub>баз</sub>:  $r_s=0,74$ ;  $p=0,00002$  и  $r_s=0,43$ ;  $p=0,049$ ; поздний NET-P<sub>баз</sub>:  $r_s=0,65$ ;  $p=0,0003$  и  $r_s=0,54$ ;  $p=0,01$  соответственно). При этом корреляции показателей базального тромбоцит-ассоциированного нетоза с уровнем фибриногена носили обратный характер ( $r_s=-0,79$ ;  $p=0,02$  и  $r_s=-0,74$ ;  $p=0,04$  для раннего и позднего нетоза соответственно).

Показатели стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P<sub>ст</sub>) у пациентов с СКВ были ассоциированы с маркерами аутоиммунного процесса (ANA, ЦИК). Так, нами выявлены отрицательные ассоциации между ранним и поздним NET-P<sub>ст</sub> и титром ANA ( $r_s=-0,79$ ;  $p=0,007$  и  $r_s=-0,88$ ;  $p=0,0008$  соответственно) и положительные с уровнем ЦИК (NET-P<sub>ст</sub>:  $r_s=0,58$ ;  $p=0,02$  и  $r_s=0,51$ ;  $p=0,043$  соответственно).

### **Заключение**

1. У пациентов с СКВ показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза повышены относительно контрольной группы (ранний нетоз: NET-P<sub>баз</sub>,  $p=0,00003$ ; NET-P<sub>ст</sub>,  $p=0,000001$ ; поздний нетоз: NET-P<sub>баз</sub>,  $p=0,00002$ ; NET-P<sub>ст</sub>,  $p=0,000001$ ).

2. Параметры раннего и позднего базального тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P<sub>баз</sub>) взаимосвязаны с маркерами воспаления (СОЭ ↔ NET-P<sub>баз</sub> ранний:  $r_s=0,74$ ;  $p=0,00002$  и СОЭ ↔ NET-P<sub>баз</sub> поздний:  $r_s=0,65$ ;  $p=0,0003$ ; СРБ ↔ NET-P<sub>баз</sub> ранний:  $r_s=0,43$ ;  $p=0,049$  и СРБ ↔ NET-P<sub>баз</sub> поздний:  $r_s=0,54$ ;  $p=0,01$ ; фибриноген ↔ NET-P<sub>баз</sub> ранний:  $r_s=-0,79$ ;  $p=0,02$  и фибриноген ↔ NET-P<sub>баз</sub> поздний:  $r_s=-0,74$ ;  $p=0,04$  соответственно).

3. Показатели раннего и позднего стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P<sub>ст</sub>) ассоциированы с маркерами аутоиммунного процесса (ЦИК:  $r_s=0,58$ ;  $p=0,02$  и  $r_s=0,51$ ;  $p=0,043$ ; ANA:  $r_s=-0,79$ ;  $p=0,007$  и  $r_s=-0,88$ ;  $p=0,0008$ ).

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Lo, M. S. Recent developments in systemic lupus erythematosus pathogenesis and applications for therapy / M. S. Lo, G. C. Tsokos // *Curr Opin Rheumatol.* – 2018. – Vol. 30, № 2. – P. 222–228.
2. Fava, A. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management / A. Fava, M. Petri // *J. Autoimmun.* – 2019. – № 96. – P. 1–13.
3. Liu, X. Platelets in Skin Autoimmune Diseases / X. Liu, C. Gorzelanny, S. W. Schneider // *Front. Immunol.* – 2019. – № 10. – P. 1453.
4. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease / V. Papayannopoulos // *Nat Rev Immunol.* – 2018. – № 18. – P. 134–147.
5. Зубкова, Ж. В. Метод оценки влияния тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей / Ж. В. Зубкова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сборник научных статей VIII Республиканской научнопрактической 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.