

УДК 616.155.25-091.818-097:616.72-002.77

Ж. В. Зубкова, И. А. Новикова, С. С. Прокопович, К. С. Макеева

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТРОМБОЦИТ-АССОЦИИРОВАННОГО НЕТОЗА С МАРКЕРАМИ АУТОИММУНИЗАЦИИ И ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Введение

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся прогрессирующим воспалением синовиальной оболочки суставов, приводящим к их деструкции и значительному снижению качества жизни пациентов [1]. Ключевым звеном в патогенезе РА является нарушение иммунологической толерантности с формированием аутоиммунного ответа, что находит отражение в продукции широкого спектра аутоантител, таких как антитела к цитруллинированным пептидам и ревматоидный фактор (РФ). Параллельно с этим, хроническое воспаление, опосредованное провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли- α , интерлейкины-1 β , -6, -17), играет центральную роль в поддержании и прогрессировании заболевания [2].

В последние годы внимание исследователей привлекает роль тромбоцитов не только как участников гемостаза, но и как активных модуляторов иммунных и воспалительных процессов. Одним из таких механизмов является тромбоцит-ассоциированный нетоз – процесс, при котором активированные тромбоциты индуцируют образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) [3]. NETs, состоящие из деконденсированной ДНК, гистонов и антимикробных пептидов, в норме предназначены для борьбы с патогенами. Однако при аутоиммунной патологии избыточное или неконтролируемое образование NETs может способствовать аутоиммунизации, выступая в качестве источника цитруллинированных аутоантигенов, и усугублять воспаление за счет повреждения окружающих тканей [4].

Несмотря на теоретическое обоснование, детальное изучение вклада тромбоцит-ассоциированного нетоза в патогенез РА остается недостаточно изученным. В частности, недостаточно данных о прямой взаимосвязи между параметрами активации тромбоцитов, их способностью индуцировать нетоз и конкретными иммунологическими и воспалительными маркерами у пациентов с РА.

Цель

Оценка взаимосвязи показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза с маркерами воспаления и аутоиммунизации у пациентов с РА.

Материалы и методы исследования

Обследовано 50 пациентов (8 мужчин и 42 женщины в возрасте от 20 до 50 лет; 44 (38; 48)), с установленным диагнозом ревматоидный артрит (ACR 1987; ACR/EULAR 2010 г., МКБ-10: M05, M06), длительностью заболевания 6 (2; 11) лет.

Исследуемым материалом являлась лейкоцитарная суспензия, полученная путем отстаивания гепаринизированной венозной крови. Для оценки влияния не активированных тромбоцитов на образование NETs (базальный нетоз; NET-Рбаз) в лунки

Секция «Клиническая лабораторная диагностика. Иммунология. Аллергология»

планшеты вносили в равные объемы (по 0,05 мл) подготовленные лейкоциты и ОТП (полученную центрифугированием в течение 5 минут при 1000 об/мин (140g)). Для исследования стимулированного нетоза (NET-Рст) использовали лейкоцитарно-тромбоцитарную клеточную культуру, в которую вносили 0,01 мл АДФ (конечная концентрация АДФ в клеточной культуре 4×10^{-6} моль/л). Культуры инкубировали в течение 30 и 150 минут при 37^оС (ранний и поздний нетоз соответственно), готовили мазки, окрашивали по Романовскому – Гимзе и микроскопировали с использованием иммерсионного увеличения (объектив 100 окуляр 10). Подсчитывали количество NETs на 200 сосчитанных нейтрофилов. Результат выражали в процентах.

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 50 лет из числа доноров ГУ «Гомельский областной центр трансфузиологии».

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica, 6.0 (StatSoft, США). Статистический анализ проводили с использованием непараметрических методов. Для оптимального представления меры центральной тенденции и меры рассеяния значений признака в выборке использовали медиану (Me) и интерквартильный размах (интервал) – значения 25-го и 75-го перцентилей.

Результаты исследования и их обсуждение

Показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с РА представлены в таблице 1.

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

| Тест-система | | Контрольная группа (n=65) | Пациенты с РА (n=49) | Уровень значимости, p |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| клеточная культура | время инкубации, мин | | | |
| NET-Рбаз, % | 30 | 2 (1; 3) | 3 (2; 5) | 0,001 |
| | 150 | 4 (2; 5) | 7 (4; 10) | 0,00009 |
| NET-Рст. % | 30 | 2 (2; 4) | 5 (3; 7) | 0,00003 |
| | 150 | 3 (2; 5) | 10 (7; 15) | 0,00001 |

Примечание – данные представлены в виде Me (25 %; 75 %)

Согласно данным, представленным в таблице 1, у пациентов с РА наблюдается повышение показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза по сравнению со здоровыми лицами. Стимуляция нетоза отмечалась как при кратковременной инкубации клеток (30 минут – ранний нетоз), так и при длительной инкубации (150 минут – поздний нетоз). Уровень базального нетоза у пациентов с РА был выше в 1,5 раза (ранний нетоз) и в 1,75 раза (поздний нетоз) по сравнению с контрольной группой. Стимулированный нетоз у пациентов с РА превышал значения здоровых лиц в 2,5 раза (ранний нетоз) и в 3,3 раза (поздний нетоз). Важно отметить, что нетоз в присутствии активированных тромбоцитов значительно выше, чем при использовании интактных тромбоцитов. У пациентов с РА стимулированный нетоз (NET-Рст) превышал базальный уровень (NET-Рбаз) как для раннего, так и для позднего теста ($p=0,004$ и $p=0,005$ соответственно).

При изучении взаимосвязи показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза с маркерами, характеризующими воспаление и аутоиммунные процессы у пациентов с РА нами установлено, что показатели как раннего, так и позднего базального

нетоза были ассоциированы с уровнями С-реактивного белка (СРБ) и РФ (ранний NET-P_{баз} ↔ СРБ: $r_s = 0,45$; $p = 0,005$; ранний NET-P_{баз} ↔ РФ: $r_s = 0,31$; $p = 0,03$; поздний NET-P_{баз} ↔ СРБ: $r_s = 0,38$; $p = 0,002$; поздний NET-P_{баз} ↔ РФ: $r_s = 0,34$; $p = 0,02$). Показатели раннего стимулированного нетоза (NET-P_{ст}) взаимосвязаны с маркерами воспаления – скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) и СРБ ($r_s = 0,32$; $p = 0,04$ и $r_s = 0,43$; $p = 0,01$ соответственно). Поздний стимулированный нетоз демонстрировал корреляции с уровнем циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и РФ ($r_s = 0,48$; $p = 0,03$ и $r_s = 0,37$; $p = 0,02$ соответственно).

Выявленные положительные корреляции параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза с маркерами воспаления (СОЭ, СРБ), ревматоидным фактором и циркулирующими иммунными комплексами позволяют рассматривать данный процесс как важное связующее звено между иммуновоспалительными нарушениями при РА. Обнаруженная связь с РФ и ЦИК согласуется с гипотезой о роли нетоза в аутоиммунизации, при которой нейтрофильные внеклеточные ловушки служат источником аутоантигенов, а также участвуют в образовании и стабилизации иммунных комплексов [4]. В свою очередь, провоспалительная среда и ЦИК потенцируют активацию тромбоцитов, замыкая порочный круг, поддерживающий хроническое воспаление и прогрессирование заболевания [5]. Таким образом, тромбоцит-ассоциированный нетоз представляет собой интегральный компонент патогенеза РА.

Выводы

1. У пациентов с РА уровень тромбоцит-ассоциированного нетоза значительно превышает значения контрольной группы (NET-P_{баз}: $p = 0,001$ и $p = 0,0009$; NET-P_{ст}: $p = 0,00003$ и $p = 0,00001$ для раннего и позднего нетоза соответственно).

2. Установлены взаимосвязи показателей раннего и позднего базального тромбоцит-ассоциированного нетоза с маркерами воспаления и аутоиммунизации (СОЭ и РФ) ($r_s = 0,45$; $p = 0,005$; $r_s = 0,31$; $p = 0,03$ и $r_s = 0,38$; $p = 0,002$; $r_s = 0,34$; $p = 0,02$).

3. Уровень стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза был ассоциирован с показателями СОЭ и СРБ в раннем ($r_s = 0,32$; $p = 0,04$ и $r_s = 0,43$; $p = 0,01$) и ЦИК и РФ в позднем тестах ($r_s = 0,48$; $p = 0,03$ и $r_s = 0,37$; $p = 0,02$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова, А. В. Применение современной фармакотерапии ревматоидного артрита в реальной клинической практике / А. В. Иванова, И. А. Николаева, О. Ю. Карабасова // Вестник Новгородского государственного университета. – 2020. – № 4. – С. 80–89.
2. Human neutrophils express low levels of FcγRIIIA, which plays a role in PMN activation / J. Golay, R. Valgardsdottir, G. Musaraj [et al.] // Blood. – 2019. – Vol. 133, iss. 13. – P. 1395–1405.
3. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций / Н. Б. Серебряная, С. Н. Шанин, Е. Е. Фомичева, П. П. Якуцени // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 9–20.
4. Gupta, S. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases / S. Gupta, M. J. Kaplan // Nature Reviews. Nephrology. – 2016. – Vol. 12, iss. 7. – P. 402–413.
5. Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis / K. L. L. Habets, L. A. Trouw, E. W. N. Levarht [et al.] // Arthritis Research and Therapy. – 2015. – Vol. 17, iss. 1. – Art. № 209.