



Рисунок 1 — Корреляционная связь параметров NET-образования с клинико-лабораторными особенностями РА

Как следует из рисунка 1, у пациентов с РА параметры нетотической активности были прямо взаимосвязаны с длительностью РА и наличием осложнений основного заболевания, количеством аутоантител (РФ, АЦЦП, АЦМВ) и величиной СОЭ, но обратно с уровнем СРБ.

Выводы

1. У пациентов с РА NET-образующая активность нейтрофилов превышала аналогичные показатели здоровых лиц ($p < 0,05$).
2. Установлены взаимосвязи нетотической активности клеток периферической крови с клиническими, иммунологическими и лабораторными особенностями РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carmelo, Carmona-Rivera. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis / Carmona-Rivera Carmelo // Sci Immunol. — 2017. — Vol. 2, № 10. — P. 3358–3372.
2. Yipp, B. G. NETosis: how vital is it? / B. G. Yipp // Blood. — 2013. — Vol. 122, № 16. — P. 2784–94.
3. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps in the second decade / V. Brinkmann // J Innate Immun. — 2018. — Vol. 10. — P. 414–421.
4. Железко, В. В. Функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с ревматоидным артритом / В. В. Железко, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. — 2015. — № 3 (45). — С. 50–54.
5. Kusworini, H. 1,25(OH)₂D₃ inhibits endothelial apoptosis by neutrophil extracellular traps externalization in systemic lupus erythematosus patients / H. Kusworini, A. P. Benny // Turk J Immunol. — 2017. — Vol. 5, № 3. — P. 89–95.

УДК 616.72-002.77-097-008.852-008.853.4-052

ТРОМБОЦИТ-АССОЦИИРОВАННЫЙ НЕТОЗ У ПАЦИЕНТОВ С ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Зубкова Ж. В.

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

Введение

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) играют значительную роль в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний (ИВРЗ), таких как ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ). Из литературных данных известно, что, образуемые нейтрофилами экстрацеллюлярные

сети, являются факторами аутоагрессии и создают условия для развития осложнений при системных заболеваниях соединительной ткани [1]. В то же время, описана способность тромбоцитов взаимодействовать с клетками иммунитета, позволяя рассматривать их в контексте воспаления и участия в иммунных реакциях. Так, например PF4 повышает фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофильных гранулоцитов, P-селектин опосредует образование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов и участвует в рекрутировании лейкоцитов в очаг воспаления. Также имеются данные, что тромбоциты способны оказывать влияние на NET-образующую способность нейтрофилов [2].

Цель

Оценить взаимосвязь количества и функциональных свойств тромбоцитов с интенсивностью нетоза у пациентов с ревматоидным артритом и системной красной волчанкой.

Материал и методы исследования

В исследование включены 51 пациент с достоверным диагнозом РА (критерии ACR/EULAR 2010 г.) и 29 пациентов с системной красной волчанкой (критерии ACR, 1997 г.) в возрасте от 20 до 50 лет. Контрольную группу составили 50 клинически здоровых доноров сопоставимых по полу и возрасту.

Агрегационные свойства тромбоцитов оценивали турбидиметрическим методом с помощью фотооптического агрегометра «СОЛАР» AP2110. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл. Определяли максимальную степень агрегации (%).

Образование NET лейкоцитами исследовалось по методу И.И. Долгушина и соавт. [3] в нашей модификации. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови (10 Ед/мл) в течение 45 минут при 37 °С. Готовили рабочую суспензию лейкоцитов, доводя до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4). Подготовленные лейкоциты смешивали в равных объемах с безтромбоцитарной плазмой (БТП). Далее клеточные культуры инкубировали в течение 30 и 150 минут при 37 °С, изготавливали мазки, окрашивали по Романовскому — Гимзе и микроскопировали. Подсчет NET осуществляли в мазках на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов: критерий U Манн — Уитни, корреляционный анализ 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

Известно, что процессы нетоза могут реализоваться с участием различных механизмов, как зависимых от активных форм кислорода (через активацию NADPH-оксидазы, «суицидальный» нетоз), так и независимым (так называемый NADPH-независимый, «витальный» нетоз). «Суицидальный» нетоз реализуется в течение 2–4 часов и сопровождается деконденсацией хроматина с последующим распадом ядерной мембраны и лизисом нейтрофила. С другой стороны, «витальный» нетоз не сопровождается гибелью клетки и происходит в течение короткого промежутка времени (5–60 минут) [4].

Данные образования нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей у пациентов с ИВРЗ представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Эффект тромбоцитов на формирование NET у пациентов с СКВ и РА

Исследуемая группа \ Условия культивирования	30 минут	150 минут
Пациенты с РА (n = 51)	5,5 (3; 7)*	9 (5; 12,5)*
Пациенты с СКВ (n = 29)	7 (5; 7)*	9 (7; 10)*
Здоровые лица (n = 65)	3 (2; 5)	4 (3; 6)

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 монокультурой

При проведении исследования было установлено, что количество NETs было значимо выше у пациентов с РА и СКВ в сравнении со здоровыми лицами как при оценке «витального» ($p = 0,006$ и $p = 0,0001$ соответственно), так и «суицидального» нетоза ($p = 0,00001$ и $p = 0,00001$ соответственно).

По данным литературы причиной повышения интенсивности нетоза могут являться тромбоциты. Данный эффект реализуется посредством прямого взаимодействия тромбоцитарных рецепторов с рецепторами на поверхности нейтрофилов (CD18, TLR4L), а также путем высвобождения биологически активных веществ (RANTES, PF4, HMGb1 и др.) в большом количестве содержащихся в гранулах тромбоцитов [5]. В связи с этим, нами был проведен анализ взаимосвязей интенсивности нетоза и количества и агрегационных свойств тромбоцитов.

В группе здоровых лиц были установлены ассоциации между степенью агрегации тромбоцитов и интенсивностью «витального» нетоза ($r = 0,41$; $p = 0,0008$). Также в данной группе формирование нейтрофильных сетей было взаимосвязано с количеством тромбоцитов в периферической крови ($r = 0,52$; $p = 0,008$). Подобные связи наблюдались и у пациентов с РА ($r = 0,34$; $p = 0,02$ и $r = 0,36$; $p = 0,01$ для агрегационной активности и количества тромбоцитов соответственно), но не у пациентов с СКВ.

«Суицидальный» нетоз в группе здоровых лиц также был ассоциирован с количеством и агрегационными свойствами тромбоцитов ($r = 0,46$; $p = 0,02$ и $r = 0,44$; $p = 0,0003$ соответственно). В то же время, у пациентов с РА нетоз был связан с агрегационной активностью тромбоцитов ($r = 0,30$; $p = 0,047$), но не с их количеством. У пациентов с СКВ ассоциаций между нетозом и тромбоцитами не выявлено.

Таким образом, у здоровых лиц и у пациентов с РА очевидна взаимосвязь тромбоцитов с NET-образованием. У пациентов с СКВ, вероятно, тромбоциты не являются основным фактором, влияющим на процесс формирования NETs.

Выводы

1. У пациентов с РА и СКВ способность к образованию нейтрофилами внеклеточных сетей повышена NADPH-зависимым ($p = 0,00001$ и $p = 0,00001$) и NADPH-независимым способами ($p = 0,006$ и $p = 0,0001$ соответственно).

2. У пациентов с РА количество нейтрофильных сетей при оценке «витального» нетоза, было прямо взаимосвязано со степенью агрегации тромбоцитов в тесте с АДФ ($r = 0,52$; $p = 0,008$) и количеством тромбоцитов ($r = 0,41$; $p = 0,0008$), тогда как у пациентов с СКВ подобных ассоциаций не выявлено.

3. У пациентов с РА обнаружены взаимосвязи между показателями «суицидального» нетоза и агрегационной активностью тромбоцитов ($r = 0,30$; $p = 0,047$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases / J. S. Knight [et al.] // *Frontiers in immunology*. — 2012. — Vol. 3 (14). — P. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.
2. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Ч. 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций / Н. Б. Серебряная [и др.] // *Медицинская иммунология*. — 2019. — № 1, Т. 21. — С. 9–20. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.
3. Долгушин, И. И. Савочкина АЮ Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова // *Вестн РАМН*. — 2010. — № 4. — С. 26–30.
4. Yipp, B. G. NETosis: how vital is it? / B. G. Yipp, P. Kubes // *Blood*. — 2013. — Vol. 122. — P. 2784–2794. doi:10.1182/blood-2013-04-457671.
5. Carestia, A. Platelets: New bricks in the building of neutrophil extracellular traps / A. Carestia, T. Kaufman, M. Schattner // *Front Immunol*. — 2016. — Vol. 7. — P. 271. doi:10.3389/fimmu.2016.00271.