

УДК 616.155.2:616.155.34]-097

**ВЛИЯНИЕ ТРОМБОЦИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ
НЕЙТРОФИЛАМИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ
С ИММУНОКОМПЛЕКСНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ***Ж. В. Зубкова, И. А. Новикова, В. В. Железко*

Гомельский государственный медицинский университет

В статье представлены результаты оценки влияния тромбоцитов на образование нейтрофилами внеклеточных ловушек. Обнаружена способность тромбоцитов угнетать формирование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами в культурах *in vitro* у пациентов с ревматоидным артритом (РА) (n = 42), системной красной волчанкой (СКВ) (n = 24), но не с геморрагическим васкулитом (ГВ) (n = 15). Выявлена взаимосвязь нетоза и концентрации ревматоидного фактора у пациентов с РА и СКВ, а также между NET-образованием и количеством тромбоцитов у пациентов с ГВ.

Ключевые слова: тромбоциты, нейтрофил, нейтрофильные внеклеточные ловушки, культуры *in vitro*.

**THE ROLE OF PLATELETS IN FORMATION
OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN PATIENTS
WITH IMMUNOCOMPLEX PATHOLOGY***J. V. Zubkova, I. A. Novikova, V. V. Zhelezko*

Gomel State Medical University

The article presents the results of the assessment of the role of platelets in formation of extracellular traps by neutrophils. We have detected the ability of platelets to oppress the formation of extracellular traps by neutrophils *in vitro* cultures in patients with rheumatoid arthritis (RA) (n = 42) and systemic lupus erythematosus (SLE) (n = 24), but not in patients with hemorrhagic vasculitis (GW) (n = 15). The study has revealed the interrelation of NETosis and rheumatoid factor in patients with RA and SLE, as well as NET formation and number of platelets in patients with GW.

Key words: platelets, neutrophil, neutrophil extracellular traps, *in vitro* cultures.

Введение

Одним из ведущих звеньев патогенеза при иммунокомплексной патологии (ИКП) является процесс повреждения сосудистой стенки иммунными комплексами и активированными белками системы комплемента с развитием васкулитов часто генерализованного характера. Вследствие наличия воспалительных изменений сосудистой стенки и окружающих тканей становится неизбежным вовлечение в процесс системы гемостаза, в частности, его сосудисто-тромбоцитарного компонента [1, 2]. Установлено, что тромбоциты путем выработки широкого спектра биологически активных веществ (серотонин, TGF β , RANTES, PF4 и др.), а также за счет прямых контактных взаимодействий с лейкоцитами способны влиять на течение воспалительного процесса. Так, тромбоциты повышают фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофильных гранулоцитов посредством взаимодействия выделяемого ими PF-4 с рецепторами на поверхности нейтрофилов [3]. Также доказано, что взаимодействие тромбоцитарных CD40L с CD40 на поверхности нейтрофилов приводит к активации миграции и экстравазации последних [4].

Одной из недавно обнаруженных функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ) является их

способность к образованию нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET) — сетеподобных структур, представляющих собой нити ДНК с включением гистонов и содержимого цитоплазматических гранул [5]. Образование большого количества внеклеточных ловушек в сосудах микроциркуляции может приводить к их повреждению и являться одним из факторов, усугубляющих течение заболеваний [6]. Обнаружена способность тромбоцитов усиливать образование сетей при некоторых заболеваниях (сепсис, острая травма легкого) через взаимодействие с TLR4 (Toll-like receptor 4) нейтрофилов [6, 7]. В то же время изучение

NET-образующей способности нейтрофилов и тромбоцитарно-нейтрофильных взаимодействий у пациентов с ИКП не проводилось.

Цель исследования

Изучить влияние тромбоцитов на способность нейтрофилов крови к формированию внеклеточных ловушек в культурах *in vitro* у пациентов с иммунокомплексной патологией.

Материалы и методы

В исследование были включены 42 пациента с достоверным ревматоидным артритом I–III степеней активности (33 женщины и 9 мужчин) в возрасте от 25 до 51 года; 24 пациента с системной красной волчанкой I–III степеней

активности (20 женщин, 4 мужчины) в возрасте 25–50 лет; 15 пациентов с впервые выявленным геморрагическим васкулитом (11 женщин 4 мужчины) в возрасте 18–32 лет. Диагнозы выставлялись на основании классификационных критериев Американской коллегии ревматологов. Контрольную группу составили 50 клинически здоровых доноров, сопоставимых с пациентами по полу и возрасту.

Материалом для исследования являлись лейкоциты, которые получали путем отстаивания гепаринизированной венозной крови (10 Ед/мл) в течение 45 минут при 37 °С, однократно отмывали в фосфатно-солевом буфере. Количество нейтрофильных гранулоцитов в суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4).

Образование NET лейкоцитами исследовалось по методу И. И. Долгушина и соавт. [8] в нашей модификации [9]. Подготовленные лейкоциты смешивали в равных объемах с питательной средой RPMI-1640 (монокультура в среде), инкубировали в течение 30 минут (в ряде исследований — 150 минут) при 37 °С, изготавливали мазки, окрашивали по Романовскому-Гимзе и микроскопировали. Для изучения тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий лейкоциты культивировали в течение указанного периода времени с равным объемом обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) с концентрацией тромбоцитов 200×10^9 – 200×10^3 кл/л (смешанная культура) либо безтромбоцитарной плазмы (БТП) (монокультура в плазме) с дальнейшим изготовлением мазков, окраской и микроскопией. Подсчет NET осуществляли в мазках на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Концентрацию общего ревматоидного фактора (РФ) определяли в сыворотке крови методом латекс-агглютинации (тест-системы ООО

«Анализ МедПром», Республика Беларусь). Результат выражали в МЕ/мл.

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

Результаты

Считается, что формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек — активный кислород-зависимый процесс, обусловленный активацией NADPH-оксидазы. При этом происходит деконденсация хроматина с последующим распадом ядерной мембраны и лизисом нейтрофила [5]. Данный процесс, получивший название «суицидальный» нетоз, занимает 3–4 часа, поэтому при исследовании *in vitro* длительность инкубации клеточной культуры рекомендована не менее 150 минут. С другой стороны, недавно был описан процесс образования NET (названный впоследствии «витальным» нетозом), который не сопровождается разрушением ядерной мембраны и лизисом клетки. В процессе реализации данного механизма происходит упаковка фрагментов ДНК в везикулы, образованные ядерной мембраной, транспорт их через цитоплазму с последующим выбросом хроматина в межклеточное пространство путем слияния с плазматической мембраной. При этом происходит превращение нейтрофилов в безъядерные клетки, способные, тем не менее, к передвижению и захвату живых микроорганизмов. Данный механизм реализуется в течение 5–60 минут и является кислород-независимым [10]. Поэтому, для ориентировочной оценки кислород-зависимого и кислород-независимого процессов NET-образования мы инкубировали клеточные культуры в течение 30 и 150 минут. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

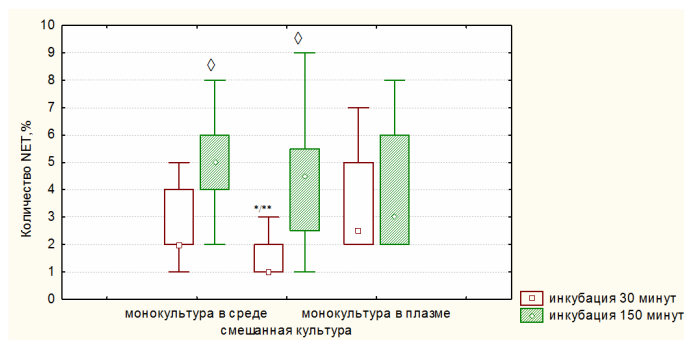


Рисунок 1 — Влияние тромбоцитов на образование аутологичными нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей в культурах *in vitro* у здоровых лиц в зависимости от длительности культивирования

Примечание. * — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с монокультурой в среде; ** — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с монокультурой в плазме; ◇ — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с 30-минутной инкубацией. Данные представлены в виде Me; 25 %; 75 %; Min-Max

Как видно на рисунке 1, образование NET в смешанной культуре (лейкоциты с ОТП) оказалось значимо ниже, чем в монокультуре (в 2 раза относительно монокультуры в среде, $p = 0,04$ и в 2,5 раза относительно монокультуры в плазме, $p = 0,02$). Однако данный эффект наблюдался только при 30-минутном культивировании и отсутствовал при увеличении длительности инкубации до 150 минут. Количество NET в присутствии безтромбоцитарной плазмы (монокультура в плазме) было сравнимым с аналогичным показателем в питательной среде. Однако отмечалась определенная особенность: в присутствии плазмы крови количество NET не зависело от длительности инкубации (30 и 150 минут), тогда как в монокультурах в среде и смешанных культурах NET-образование было значимо выше при инкубации 150 минут ($p = 0,007$ и $p = 0,0001$ соответственно).

Нами проанализирована зависимость образования NET от количества присутствующих в культуре тромбоцитов. Оказалось, что описанный выше эффект подавления NET-образования в присутствии ОТП наблюдался только при концентрации тромбоцитов 200×10^7 кл/л и

более ($p = 0,03$). Именно такая концентрация тромбоцитов является минимально достаточной для исследования их влияния на NET-образующие свойства нейтрофилов в краткосрочной культуре *in vitro*. Тем не менее более стабильный эффект был достигнут при концентрации 200×10^9 кл/л, которая и была использована нами для дальнейших исследований.

Известно, что при иммунокомплексных заболеваниях способность нейтрофилов крови к образованию внеклеточных ловушек увеличивается [11]. В наших исследованиях также установлено, что количество NET в 30-минутной культуре лейкоцитов, инкубированной в среде, было повышено у пациентов с ГВ, СКВ и РА ($p = 0,008$, $p = 0,009$ и $p = 0,009$ соответственно). При инкубации клеток 150 минут количество сетей также увеличивалось в сравнении с контрольной группой: в 2 раза у пациентов с ГВ ($p = 0,001$), в 1,4 раза у пациентов с СКВ ($p = 0,03$) и в 1,8 раз у пациентов с РА ($p = 0,001$) (таблица 1). В определенной мере это свидетельствует, что у пациентов с ИКП активированы процессы как «суицидального», так и «витального» нетоза.

Таблица 1 — Образование внеклеточных ловушек лейкоцитами (монокультура в среде) пациентов с ИКП и здоровых лиц

Длительность культивирования	Контрольная группа (n = 50)	Пациенты		
		ГВ (n = 15)	СКВ (n = 24)	РА (n = 42)
30 минут	2 (2; 4)	6 (5; 9)*	6 (5; 7)*	6 (4; 9)*
150 минут	5 (4; 6)	10 (8; 14)*	7 (7; 14)*	9 (7; 11)*

Примечание. Данные представлены в виде Ме (25%;75%); * — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой.

Внесение в культуры лейкоцитов плазмы как бедной (БТП), так и обогащенной тромбоцитами (ОТП), содержащей тромбоциты в ко-

личестве 200×10^9 кл/л, изменяло способность нейтрофилов пациентов к образованию сетей (рисунок 2).

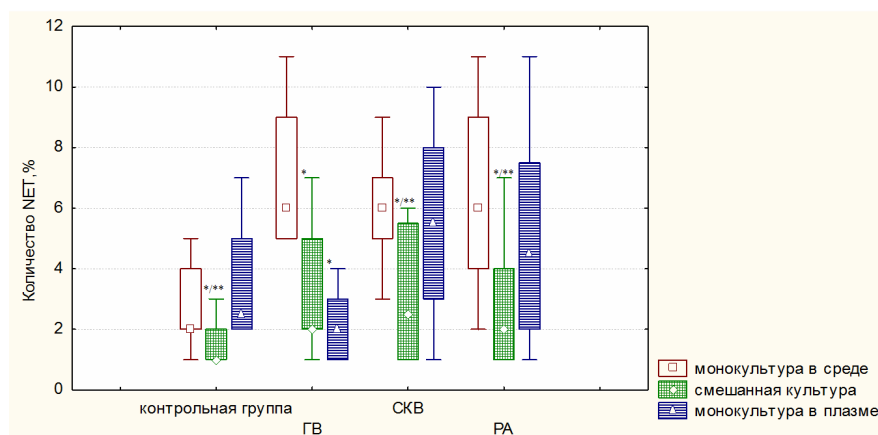


Рисунок 2 — Влияние бедной и обогащенной тромбоцитами плазмы (монокультура в плазме и смешанная культура соответственно) на формирование NET *in vitro* у пациентов с ИКП (длительность культивирования 30 минут)

Примечание. * — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с инкубацией в среде; ** — различия значимы ($p < 0,05$) в сравнении с уровнем NET в монокультуре в плазме

Выявлено, что у пациентов с ГВ, СКВ и РА, как и у здоровых лиц, наблюдалось снижение способности нейтрофилов к образованию экстрацеллюлярных сетей в смешанной культуре (лейкоциты с тромбоцитами) ($p = 0,02$; $p = 0,03$ и $p = 0,004$ соответственно) относительно NET в монокультуре в среде (лейкоциты с питательной средой). В то же время у пациентов с ГВ отмечались значимые различия количества NET в монокультурах в плазме и среде ($p = 0,03$), которые отсутствовали у здоровых лиц и пациентов с РА и СКВ. Это позволяет предположить присутствие в плазме пациентов с ГВ факторов, угнетающих NET, что нивелирует влияние самих тромбоцитов на формирование NET. Угнетающее действие бедной тромбоцитами плазмы (монокультура в плазме) на процесс образования сетей у пациентов с ГВ проявился и при увеличении времени культивирования клеток до 150 минут ($p = 0,02$).

По данным литературных источников, стимулятором высвобождения NET у пациентов с иммунокомплексной патологией могут выступать различные биологически активные факторы (РФ, фактор Виллебранда и др.) [12, 13].

Нами проанализирована зависимость уровня NET в культурах *in vitro* от концентрации РФ в сыворотке крови пациентов с РА и СКВ. Установлено, что у пациентов с серопозитивным РА ($n = 19$) (концентрация РФ 100,0 (64,0; 290,0)) уровень NET в смешанной культуре (лейкоциты с тромбоцитами) при 150-минутной инкубации был значимо выше, чем у пациентов с серонегативным РА ($n = 23$; $p = 0,003$). Такой же эффект наблюдался в монокультурах в среде и плазме ($p = 0,03$ и $p = 0,04$ соответственно). При этом между концентрацией РФ и количеством NET в данных тестах обнаруживалась прямая взаимосвязь ($r = 0,8$, $p = 0,0004$; $r = 0,53$, $p = 0,03$ и $r = 0,6$, $p = 0,04$ соответственно). У пациентов с СКВ с положительным РФ ($n = 10$) (концентрация 48,0 (16,0; 143,0)) также наблюдался более высокий уровень NET в монокультурах в среде и плазме ($p = 0,05$ и $p = 0,04$ соответственно) и выявлена прямая взаимосвязь РФ↔NET ($r = 0,9$, $p = 0,05$ и $r = 0,8$, $p = 0,003$ соответственно) (рисунок 3). Однако данный эффект проявлялся только в 150-минутных культурах, но отсутствовал при 30-минутной инкубации.

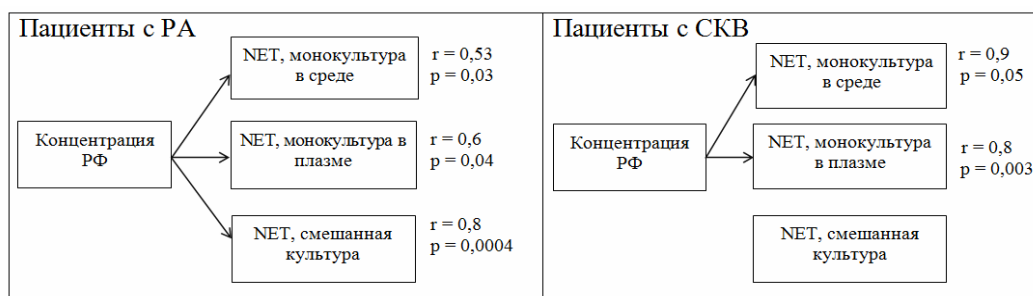


Рисунок 3 — Корреляции количества NET в различных тест-системах и концентрации РФ в сыворотке крови у пациентов с РА и СКВ

На рисунке 3 отчетливо видно, что способность нейтрофилов крови пациентов с РА и СКВ к образованию внеклеточных ловушек тесно взаимосвязана с концентрацией РФ, тогда как образование NET в смешанной культуре *in vitro* коррелировало с количеством РФ только у пациентов с РА. Учитывая, что описанные взаимосвязи выявляются исключительно в культурах лей-

коцитов, инкубированных в течение 150 минут, можно предположить, что присутствие РФ в крови влияет только на «суицидальный» тип нетоза.

Анализ взаимосвязи образования NET в культуре *in vitro* и содержания тромбоцитов в периферической крови позволил установить наличие значимых корреляций только у пациентов с ГВ (рисунок 4).

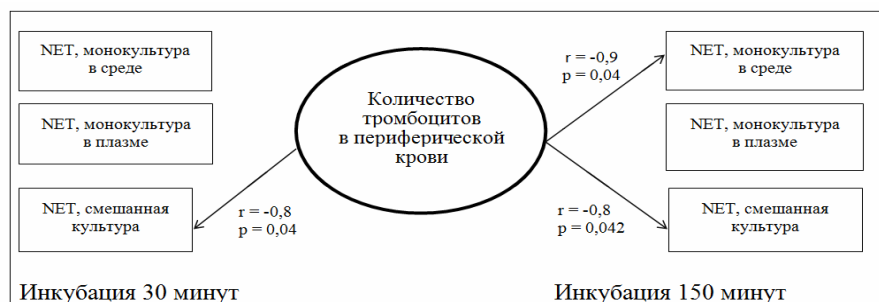


Рисунок 4 — Корреляции количества NET в культуре *in vitro* с количеством тромбоцитов в периферической крови пациентов с ГВ

Выявлены взаимосвязи между количеством тромбоцитов в крови (234,0 (224,0; 312,0)) и способностью лейкоцитов к образованию NET при 150-минутной инкубации в питательной среде ($r = -0,9$; $p = 0,04$), а также в смешанной культуре при инкубации в течение 30 и 150 минут ($r = -0,8$; $p = 0,04$ и $r = -0,8$; $p = 0,042$ соответственно). Принимая во внимание, что зависимость NET от количества тромбоцитов у пациентов с ГВ носит обратный характер и обнаруживается в смешанных культурах (лейкоциты с тромбоцитами) при инкубации 30 и 150 минут, можно предположить, что угнетающее действие тромбоциты проявляют как на «суицидальный», так и на «витальный» типы нетоза.

Полученные результаты свидетельствуют, что тромбоциты крови являются одним из факторов регуляции процессов нетоза.

Выводы

1. Обогащенная тромбоцитами плазма угнетает способность аутологичных нейтрофилов к образованию экстрацеллюлярных сетей в культурах *in vitro* у здоровых лиц, пациентов с РА и СКВ, но не у пациентов с геморрагическим васкулитом. Эффект наблюдается только при совместной инкубации лейкоцитов с тромбоцитами в течение 30 минут, что позволяет предположить угнетение кислород-зависимого механизма нетоза.

2. Концентрация РФ в сыворотке крови прямо взаимосвязана со способностью нейтрофилов к образованию экстрацеллюлярных сетей как при РА ($r = 0,53$, $p = 0,03$ в монокультуре в среде, $r = 0,9$, $p = 0,05$ в монокультуре в плазме), так и при СКВ ($r = 0,6$, $p = 0,04$ в монокультуре в среде, $r = 0,8$, $p = 0,003$ в монокультуре в плазме).

3. Влияние тромбоцитов на кислород-зависимый и кислород-независимый механиз-

мы нетоза у пациентов с геморрагическим васкулитом обратно ассоциирован с количеством тромбоцитов ($r = -0,8$; $p = 0,042$ и $r = -0,9$; $p = 0,04$ соответственно).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Rondina, M. T. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases / M. T. Rondina, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman // *Circulation Research*. — 2013. — P. 1506–1519.
2. Gomez-Puerta, J. A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody pathogenesis in small-vessel vasculitis / J. A. Gomez-Puerta // *The American Journal of Pathology*. — 2009. — Vol. 175, № 5. — P. 1790–1798.
3. Johansson, D. Platelet and neutrophil responses to gram positive pathogens in patients with bacteremic infection / D. Johansson, O. Shannon, M. Rasmussen // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 11. — P. 1–9.
4. Zarbock, A. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation / A. Zarbock, R. K. Polanowska-Grabowska, K. Ley // *Blood Reviews*. — 2007. — Vol. 21. — P. 99–111.
5. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535.
6. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury / A. Caudrillier [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2012. — Vol. 122, № 7. — P. 2661–2671.
7. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood / S. R. Clark [et al.] // *Nature Medicine*. — 2007. — Vol. 13, № 4. — P. 463–469.
8. Долгушин, И. И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // *Аллергология и иммунология*. — 2009. — Т. 10, № 3. — С. 458–462.
9. 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. Лычиков [и др.]. — Гомель, 2014. — Т. 1. — С. 142–143.
10. Yipp, B. G. NETosis: how vital is it? / B. G. Yipp, P. Kubas // *Blood*. — 2013. — Vol. 122, № 16. — P. 2784–2794.
11. Kaplan, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases / M. J. Kaplan // *Arthritis Research & Therapy*. — 2013. — Vol. 15. — P. 219–228.
12. 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.
13. Von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps / S. Grässle [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. — 2014. — P. 1382–1389.

Поступила 03.06.2016

УДК 616.441-092-089

ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОГО ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА

А. В. Величко¹, З. А. Дундаров², В. В. Похожай², С. Л. Зыблев²

¹Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель
²Гомельский государственный медицинский университет

Первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ) — заболевание, развивающееся в результате первичного поражения паращитовидных желез (ПЩЖ) (аденома, гиперплазия, рак), обусловленное гиперпродукцией паратиреоидного гормона и проявляющееся нарушением обмена кальция и фосфора, поражением костной системы и (или) внутренних органов. Единственно приемлемым и патогенетически обоснованным методом коррекции ПГПТ в настоящее время является хирургический.

В современной эндокринной хирургии до сих пор нет единого мнения относительно единых подходов к оперативному лечению патологии ПЩЖ. На данный момент применяются различные виды оперативных вмешательств. Наиболее широко используется классический поперечный доступ к щитовидной железе по Кохеру. Однако все большее значение приобретает мини-доступ в комбинации с различными видами анестезиологического пособия.

В данной статье приведены результаты исследования 200 пациентов после паратиреоидэктомии с применением различных методик хирургического пособия.

Ключевые слова: первичный гиперпаратиреоз, паратиреоидэктомия, цервикальный доступ по Кохеру, мини-доступ, эндотрахеальный наркоз, местная анестезия.