

УДК 616.72-002.77+616.5-002.525.2]-091.818

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-11>

Тромбоцит-ассоциированный нетоз в мониторинге воспаления при ревматоидном артрите и системной красной волчанке

Ж. В. Зубкова

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Оценить возможность использования параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза для мониторинга активности воспаления при ревматоидном артрите (РА) и системной красной волчанке (СКВ).

Материалы и методы. Обследовано 50 пациентов с РА и 29 пациентов с СКВ в динамике заболевания. Проведена оценка параметров раннего и позднего тромбоцит-ассоциированного нетоза в аутологических смешанных культурах, содержащих лейкоцитарную суспензию и интактные и стимулированные АДФ тромбоциты.

Результаты. У пациентов с РА и СКВ в стадии обострения повышены показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза относительно аналогичных показателей у здоровых лиц ($p = 0,00001-0,001$). В период клинической ремиссии параметры нетоза снижались в сравнении со стадией обострения (NET-P_{cr}: $p = 0,017-0,04$), в ряде случаев достигая контрольных значений. На основании регрессионного анализа определены пороговые значения параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза для оценки активности воспалительного процесса у пациентов с РА и СКВ.

Заключение. Параметры тромбоцит-ассоциированного нетоза являются информативными лабораторными маркерами активности воспалительного процесса у пациентов с РА и СКВ.

Ключевые слова: тромбоцит-ассоциированный нетоз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Зубкова ЖВ. Тромбоцит-ассоциированный нетоз в мониторинге воспаления при ревматоидном артрите и системной красной волчанке. *Проблемы здоровья и экологии.* 2023;20(4):87–93. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-11>

Platelet-associated NETosis in monitoring inflammation in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus

Zhanna V. Zubkova

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To assess the possibility of using platelet-associated NETosis parameters to monitor inflammatory activity in rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE).

Materials and methods. 50 patients with RA and 29 patients with SLE were examined. The parameters of early and late platelet-associated NETosis were assessed in autologous mixed cultures containing a leukocyte suspension and intact and ADP-stimulated platelets.

Results. In patients with RA and SLE in the acute stage, rates of platelet-associated NETosis were increased compared to healthy individuals ($p = 0,00001-0,001$). During the period of clinical remission, NETosis parameters decreased in comparison with the exacerbation stage (NET-Pst: $p=0,017-0,04$), in some cases reaching control values. Based on regression analysis, threshold values for platelet-associated NETosis parameters were determined to assess the activity of the inflammatory process in patients with RA and SLE.

Conclusion. Parameters of platelet-associated NETosis are informative laboratory markers of the inflammatory process in patients with RA and SLE.

Keywords: platelet-associated NETosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus

Conflict of interests. Author declares no conflict of interest.

Funding. The study was conducted without sponsorship.

For citation: Zubkova ZhV. Platelet-associated NETosis in monitoring inflammation in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Health and Ecology Issues.* 2023;20(4):87–93. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-11>

Введение

Ревматоидный артрит и системная красная волчанка характеризуются хроническим течением с чередованием стадий обострения и ремиссии. В клинической практике существенной проблемой для этих заболеваний является объективная оценка стадии воспалительного процесса (обострение/ремиссия) [1]. В настоящее время для этого используются клинические признаки (наличие и степень выраженности кожных, суставных, сосудистых, неврологических проявлений, а также общая оценка пациентами состояния здоровья по аналоговым шкалам) и общепринятые маркеры активности воспалительного процесса (скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и С-реактивный белок (СРБ)) [1, 2]. Однако применение клинических симптомов для мониторинга воспаления достаточно субъективно, а используемые лабораторные параметры зачастую имеют слабую выраженность изменений [3]. В связи с этим поиск новых лабораторных тестов, обладающих хорошими диагностическими характеристиками, представляет актуальное направление в научно-практических исследованиях.

Известно, что в многообразии патогенетических механизмов, лежащих в основе данных заболеваний, важная роль принадлежит нейтрофильным гранулоцитам. Особое значение отводится их способности к образованию нейтрофилами внеклеточных сетей. Активация нетоза и нарушение клиренса NETs продемонстрировано при многих аутоиммунных заболеваниях, в том числе при РА и СКВ. При этом подчеркивается, что нейтрофильные сети могут инициировать и поддерживать воспалительный процесс, способствовать развитию аутоиммунизации [4].

Одним из факторов, оказывающих влияние на процесс нетоза, являются тромбоциты [5, 6]. Тромбоцит-ассоциированный нетоз при аутоиммунных заболеваниях связывают с развитием осложнений, таких как сердечно-сосудистая патология, волчаночный нефрит, прогрессирование воспаления суставов и др. [7, 8]. В свою очередь, компоненты нейтрофильных ловушек (гистоновые белки, ДНК и др.) способны активировать тромбоциты, приводя к развитию феномена, получившего название иммунотромбоз [9].

Цель исследования

Оценить возможность использования параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза для мониторинга активности воспаления при РА и СКВ.

Материалы и методы

В исследование включены 50 пациентов (25 — серопозитивных и 25 — серонегативных

по общему ревматоидному фактору) с достоверным диагнозом РА (критерии ACR/EULAR 2010 г.) в возрасте 44 (38; 48) года, среди них 42 женщины и 8 мужчин. Степень активности РА согласно индексу DAS28 квалифицировалась как низкая у 14 (28 %) пациентов, умеренная — у 22 (44 %), высокая — у 14 (28 %) человек. Также в исследование включены 29 пациентов с системной красной волчанкой (28 женщин и 1 мужчина) в возрасте 30 (27; 40) лет. Диагноз был установлен на основании классификационных диагностических критериев (ACR, 1997). Длительность анамнеза варьировала от 3 месяцев 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 %) обследованных.

Все пациенты проходили лечение в ревматологическом отделении учреждения «Гомельская областная клиническая больница» и были обследованы в день поступления на стационарное лечение. Повторное исследование проводилось по достижении пациентами клинического улучшения (26 пациентов — с РА; 15 пациентов — с СКВ) накануне выписки из стационара. В исследование не включались лица, имеющие ВИЧ-инфекцию, первичный иммунодефицит, злокачественные новообразования, острые инфекционно-воспалительные заболевания, сахарный диабет.

Определение параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза проводили в аутологических смешанных культурах, включавших равные объемы лейкоцитарной суспензии (концентрация — 5×10^6 клеток/мл) и плазмы, содержащей тромбоциты в концентрации 200×10^9 клеток/л [10]. Исследовали базальный тромбоцит-ассоциированный нетоз в культурах, содержащих лейкоциты и интактные тромбоциты (NET- $P_{\text{баз}}$) и стимулированный тромбоцит-ассоциированный нетоз, при совместном культивировании лейкоцитов и тромбоцитов, стимулированных АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл раствор (NET- $P_{\text{ст}}$). Подготовленные культуры инкубировали в течение 30 минут (ранний нетоз) или 150 минут (поздний нетоз) при 37 °С. Далее изготавливали мазки, окрашивали по Романовскому – Гимзе и микроскопировали. Подсчет NET осуществляли на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражали в процентах.

Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов: W-критерия Вилкоксона, критерия U Манна – Уитни. Прогностическую значимость изучаемых параметров выявляли методом логистического регрессион-

ного анализа, для оценки клинической информативности теста и выбора пороговых значений проводили ROC-анализ. Результат выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (25 %; 75 %). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На момент выписки из стационара у обследованных пациентов наблюдалось уменьшение клинических проявлений заболевания. У пациентов с РА уменьшились припухлость, болезненность, скованность в суставах. У пациентов с СКВ снизились кожные, суставные, неврологические и другие проявления. При этом следует

отметить, что лабораторный показатель активности воспалительного процесса (СОЭ) на момент госпитализации был повышен только у 29 (58 %) пациентов с РА и у 11 (38 %) пациентов с СКВ (31 (23; 42) и 27 (24; 36) мм/ч соответственно). На момент выписки положительной динамики СОЭ у пациентов с РА и СКВ не наблюдалось ($p > 0,05$). Уровень СРБ при поступлении в стационар имел повышенные значения только у 50 % пациентов, при этом его снижение на момент выписки имело слабовыраженный характер.

Результаты оценки параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза представлены в таблице 1.

Таблица 1. Тромбоцит-ассоциированный нетоз у пациентов с РА и СКВ
Table 1. Platelet-associated NETosis in patients with RA and SLE

Тест-система		Контрольная группа	Пациенты с РА		Пациенты с СКВ	
			стадия обострения	клиническая ремиссия	стадия обострения	клиническая ремиссия
NET-P _{баз} , %	ранний нетоз	2 (1; 3)	3 (2; 4)*	2 (1; 3)**	5 (2,5; 7,5)*	2 (1; 3)
	поздний нетоз	4 (2; 5)	6 (4; 10)*	4 (3; 7)	8,5 (5; 12)*	5 (3; 6)
NET-P _{ст} , %	ранний нетоз	2 (2; 4)	3 (2; 6,5)*	3 (2; 4)**	7,5 (6; 10)*	4 (2; 5)**
	поздний нетоз	3 (2; 5)	10,5 (4; 15)*	4,5 (3; 8)*/**	10 (8,5; 14,5)*	7 (3; 8) */**

*Различия значимы относительно контрольной группы ($p \leq 0,05$; U-критерий Манна – Уитни).

**Различия значимы в сравнении с пациентами в стадии обострения ($p \leq 0,05$; W-критерий Вилкоксона).

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

Как следует из данных таблицы 1, у пациентов с РА в стадии обострения заболевания повышены показатели раннего и позднего тромбоцит-ассоциированного нетоза в базальном (NET-P_{баз}: $p = 0,001$ и $p = 0,00009$ соответственно) и стимулированном (NET-P_{ст}: $p = 0,00003$ и $p = 0,00001$ соответственно) тестах в сравнении с аналогичными показателями в контрольной группе. Аналогичная картина (активация базального и стимулированного нетоза) отмечалась у пациентов с СКВ ($p \leq 0,0001$). Одновременная оценка нетоза при краткосрочной и длительной инкубации позволила нам оценить значения раннего («витального», кислород-независимого) и позднего («суицидального», кислород-зависимого) нетоза [6]. Исследования показали, что у пациентов с РА и СКВ вектор изменения этих параметров имел одинаправленный характер.

По достижении клинической ремиссии у пациентов с РА наблюдалось снижение показателей раннего нетоза как в базальном ($p = 0,004$), так и в стимулированном ($p = 0,017$) тестах в сравнении с периодом обострения. При этом количество нейтрофильных сетей достигало зна-

чений контрольной группы. Показатели позднего нетоза снижались только в стимулированном тесте (NET-P_{ст}: $p = 0,025$), однако количество NETs оставалось выше уровня здоровых лиц ($p = 0,046$).

У пациентов с СКВ уровень NETs при оценке тромбоцит-ассоциированного нетоза в период клинического улучшения был значимо ниже в тестах P-NET_{ст} в сравнении со стадией обострения ($p = 0,03$; $p = 0,04$ для раннего и позднего нетоза соответственно), но только показатели раннего нетоза снижались до контрольных значений.

Таким образом, показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с РА и СКВ существенно изменялись в зависимости от активности заболевания. Основываясь на этом, мы оценили возможность их использования в качестве диагностических показателей с помощью метода логистической регрессии. В качестве независимых переменных использовали показатели тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P_{баз}: ранний и поздний нетоз и NET-P_{ст}: ранний и поздний нетоз), в качестве зависимых переменных — активность воспалительного процесса

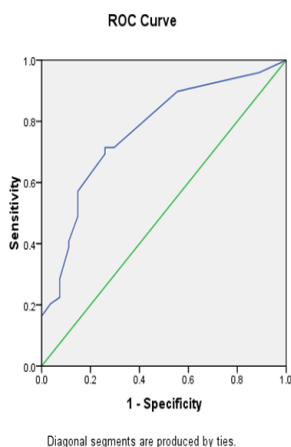
(обострение / клиническая ремиссия). Данные регрессионного анализа параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с РА в зависимости от активности воспаления представлены в таблице 2.

Таблица 2. Значения параметров логистической регрессии у пациентов с РА
Table 2. Values of the logistic regression parameters in patients with RA

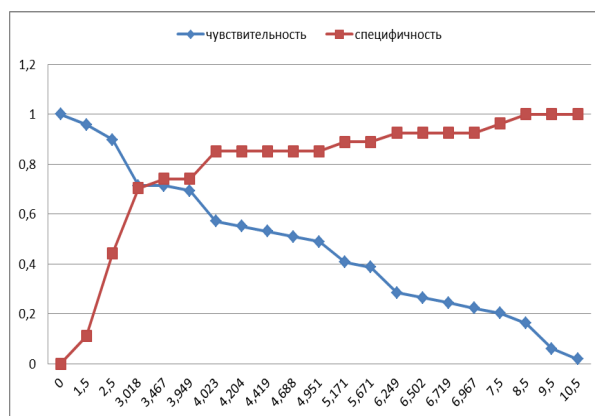
Показатель	AUC	Доверительный интервал		Чувствительность	Специфичность
		ДИ -95 %	ДИ +95 %		
NET-P _{CT} (ран.)	0,77	0,66	0,88	71,6 %	70,4 %
NET-P _{CT} (позд.)	0,79	0,68	0,90	75,5 %	74,1 %

На основании проведенного анализа установлено, что наибольшую диагностическую значимость для оценки воспалительного процесса при РА имеют показатели стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза. Для каждого показателя с помощью ROC-анализа были определены пороговые значения (рисунок 1).

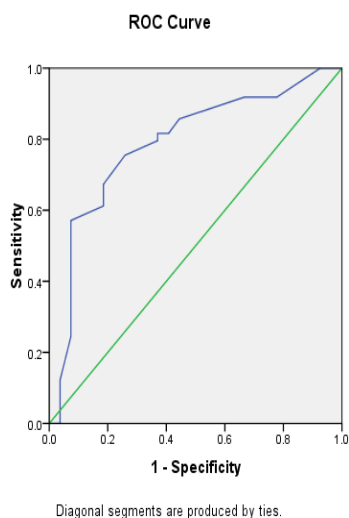
ROC-кривая для NET-P_{CT} (ран.)



Точка баланса между чувствительностью и специфичностью



ROC-кривая для NET-P_{CT} (позд.)



Точка баланса между чувствительностью и специфичностью

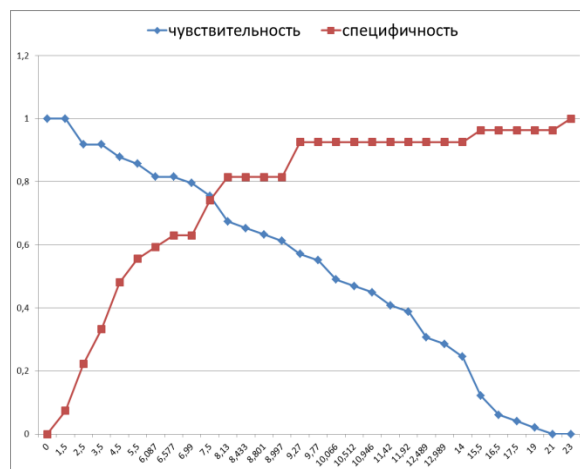


Рисунок 1. ROC-анализ показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с РА
Figure 1. ROC analysis of parameters of platelet-associated NETosis in patients with RA

На рисунке 1 видно, что оптимальные пороговые значения составили: для NET-P_{ст} (ранний) — 3,0 %, для NET-P_{ст} (поздний) — 7,5 %. Таким образом, значения параметров NET-P_{ст} (ранний) < 3 % и NET-P_{ст} (поздний) < 7,5 % у пациентов с РА свидетельствуют о наступлении ремиссии. Данная модель обладает специ-

фичностью — 87,8 % и чувствительностью — 63,0 %. При этом диагностическая эффективность составляет 78,9 %. Прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов составляет 73,9 и 81,1 % соответственно.

Результаты регрессионного анализа у пациентов с СКВ представлены в таблице 3.

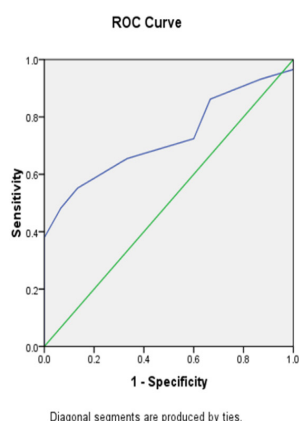
Таблица 3. Значения параметров логистической регрессии у пациентов с СКВ
Table 3. Values of the logistic regression parameters in patients with SLE

Показатель	AUC	Доверительный интервал		Чувствительность	Специфичность
		ДИ -95 %	ДИ +95 %		
NET-P _{баз} (позд.)	0,73	0,58	0,87	65,5 %	66,7 %
NET-P _{ст} (ран.)	0,79	0,64	0,94	86,2 %	73,3 %

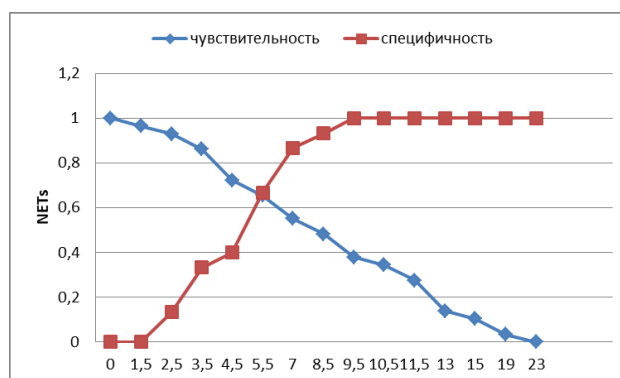
При проведении анализа установлено, что наибольший вклад в оценку активности воспалительного процесса у пациентов с СКВ вносят показатели нетоза NET-P_{баз} (поздний) и NET-P_{ст}

(ранний). В связи с этим далее нами была проведена оценка диагностических характеристик наиболее значимых тестов с помощью ROC-анализа (рисунок 2).

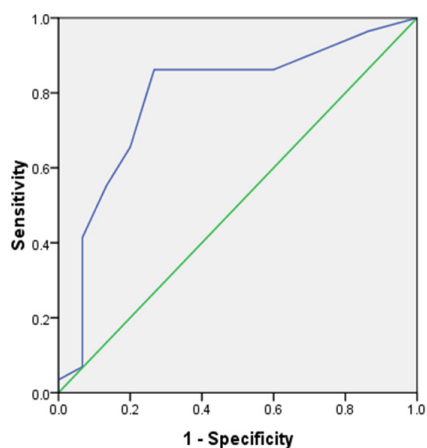
ROC-кривая для NET-P_{баз} (поздний)



Точка баланса между чувствительностью и специфичностью



ROC-кривая для NET-P_{ст} (ранний)



Точка баланса между чувствительностью и специфичностью

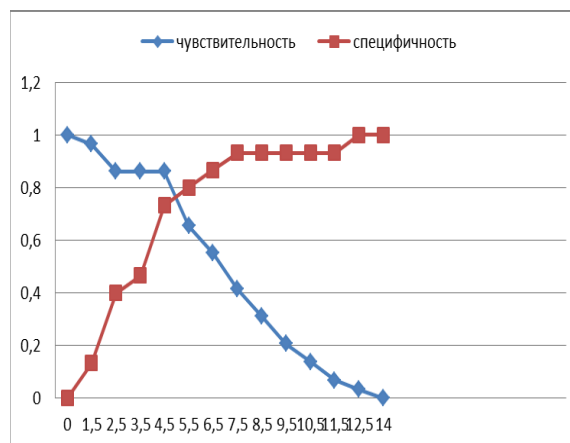


Рисунок 2. ROC-анализ показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с СКВ
Figure 2. ROC analysis of parameters of platelet-associated NETosis in patients with SLE

На основании проведенного анализа были определены пороговые значения для показателей тромбоцит-ассоциированного нетоза у пациентов с СКВ: NET-P_{баз} (поздний) — 5,5 % и NET-P_{ст} (ранний) — 4,5 %. Таким образом, значения параметров NET-P_{баз} (поздний) < 5,5 % и NET-P_{ст} (ранний) < 4,5 % свидетельствуют об отсутствии активного воспаления при СКВ. Диагностическая эффективность модели составляет 84,1 %, чувствительность и специфичность — 66,7 и 93,1 % соответственно. При этом положительная прогностическая ценность данной модели находится в пределах 83,3 %, отрицательная — 84,4 %.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования параметров тромбоцит-ассоциированного нетоза для мониторинга активности воспалительного процесса у пациентов с РА и СКВ.

Заключение

1. У пациентов с РА и СКВ в стадии обострения заболевания параметры базального и стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P_{баз} и NET-P_{ст}) повышены в сравнении с контрольной группой ($p = 0,00001–0,001$).

2. В стадии клинической ремиссии у пациентов с РА и СКВ установлено снижение параметров стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза относительно периода обострения (NET-P_{ст}; $p = 0,017–0,04$).

3. Показатели стимулированного тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-P_{ст}) являются информативными лабораторными критериями для наступления ремиссии у пациентов с РА. Оптимальные пороговые значения составили: для NET-P_{ст} (ранний) — 3,0 %, для NET-P_{ст} (поздний) — 7,5 % (специфичность — 87,8 %; чувствительность — 63,0%; диагностическая эффективность — 78,9 %).

4. У пациентов с СКВ в качестве информативных лабораторных критериев активности воспалительного процесса наибольшее диагностическое значение имеют NET-P_{баз} (поздний) и NET-P_{ст} (ранний). Оптимальные пороговые значения составили: NET-P_{баз} (поздний) < 5,5 % и NET-P_{ст} (ранний) < 4,5 % (чувствительность и специфичность — 66,7 и 93,1 % соответственно; диагностическая эффективность — 84,1 %).

Список литературы / References

1. Зинчук И.Ю., Амирджанова В.Н. Социальное бремя ревматоидного артрита. *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(3):331-335.

DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-331-335>

Zinchuk IYu, Amirdzhanova VN. Social burden of rheumatoid arthritis. *Rheumatology Science and Practice*. 2014;52(3):331-335. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-331-335>

2. Панафидина Т.А., Попкова Т.В., Асеева Е.А., Лиля А.М. Современный подход в диагностике и лечении системной красной волчанки. *Доктор.Ру*. 2021;20(7):40-50.

DOI: <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2021-20-7-40-50>

Panafidina TA, Popkova TV, Aseeva EA, Lila AM. A Modern Approach to the Diagnosis and Management of Systemic Lupus Erythematosus. *Doctor.Ru*. 2021;20(7):40-50. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2021-20-7-40-50>

3. Насонов Е.Л., Олюнин Ю.А., Лиля А.М. Ревматоидный артрит: проблемы ремиссии и резистентности к терапии. *Научно-практическая ревматология*. 2018;56(3):263-271.

DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-263-271>

Nasonov EL, Olyunin YuA, Lila AM. Rheumatoid arthritis: the problems of remission and therapy resistance. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2018;56(3):263-271 (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-263-271>

4. Kaplan MJ Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2013 2013, 15:219.

DOI: <https://doi.org/10.1186/ar4325>

5. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якусени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций. *Медицинская иммунология*. 2019;21(1):9-20.

DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-9-20>

Serebryanaya NB, Shanin SN, Fomicheva EE, Yakuseni PP. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Thrombocytes as participants of

immune reactions. *Medical Immunology*. 2019;21(1):9-20. (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-9-20>

6. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev*. 2015;14(7):633-640.

7. Tsokos GC. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*. 2020;21(6):605-614.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0677-6>

8. O'Neil LJ, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in vascular damage in systemic lupus erythematosus. *J Clin Med*. 2019;8:1325.

9. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю. Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите. *Вестник РАМН*. 2010;(4):26-30.

Dolgushin II, Shishkova YuS, Savochkina AYU. Technologies for determining and the role of neutrophil extracellular traps in antimicrobial protection. *Vestnik RAMS*. 2010;(4):26-30. (in Russ.).

10. Зубкова Ж.В. Метод оценки влияния тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей. В: Проблемы и перспективы развития современной медицины: сборник научных статей VIII Республиканской научнопрактической конференции с международным участием студентов и молодых ученых; 2016, 28 апреля; Гомель. Гомель: ГомГМУ; 2016. С. 269-271. [дата обращения 2023 октябрь 18]. Режим доступа: <https://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/10302>

Zubkova ZhV. Method for assessing the influence of platelets on the formation neutrophil extracellular traps. In: Problems and prospects for the development of modern medicine: a collection of scientific articles of the VIII Republican Scientific and Practical Conference with the international participation of students and young scientists; 2016, April 28; Gomel. Gomel: GomSMU; 2016. pp. 269-271. [date of access 2023 October 18]. Available from: <https://elib.gsmu.by/handle/GomSMU/10302>

Информация об авторе / Information about the author

Зубкова Жанна Васильевна, старший преподаватель кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0190-3856>

e-mail: janys@yandex.ru

Zhanna V. Zubkova, Senior Lecturer at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0190-3856>

e-mail: janys@yandex.ru

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Зубкова Жанна Васильевна

e-mail: janys@yandex.ru

Zhanna V. Zubkova

e-mail: janys@yandex.ru

Поступила в редакцию / Received 30.10.2023

Поступила после рецензирования / Accepted 08.11.2023

Принята к публикации / Revised 27.11.2023