

© БЕДИНА С. А., МОЗГОВАЯ Е. Э., ТРОФИМЕНКО А. С., МАМУС М. А., СПИЦИНА С. С., ЗБОРОВСКАЯ И. А.

УДК 612.112.91; 612.112.95; 616-008.1; 616-092.4

DOI: 10.20333/25000136-2022-6-86-92

Внеклеточные ловушки нейтрофилов: динамика образования, ассоциированная с переходом от ремиссии к активному ревматоидному артриту

С. А. Бедина, Е. Э. Мозговая, А. С. Трофименко, М. А. Мамус, С. С. Спицина, И. А. Зборовская

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского, Волгоград 400138, Российская Федерация

Цель исследования. Оценить основные параметры образования внеклеточных ловушек нейтрофилов (нетоза) и их изменение, ассоциированное с переходом из состояния ремиссии к активному аутоиммунному воспалению у больных ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы. В исследование вошло 37 больных (6 мужчин и 31 женщина) с верифицированным диагнозом РА на основе критериев ACR/EULAR 2010, составивших основную группу. Референтную группу составили 30 здоровых лиц. Нейтрофилы выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола. Качественный состав нейтрофильной фракции оценивали методом микроскопии мазков, окрашенных по Май-Грюнвальду, жизнеспособность клеток – окрашивая их трипановым синим, степень активации – стандартным тестом с нитросиним тетразолием. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) стимулировали раствором 50 нМ форбол-12-миристат-13-ацетата, эффект оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты. У больных РА в состоянии ремиссии по сравнению с референтной группой обнаружена более высокая способность нейтрофилов к спонтанному и индуцированному образованию NETs. Переход от ремиссии к активному РА характеризуется значительным увеличением индуцированного и, особенно, спонтанного образования NETs. У больных активным РА темп прироста спонтанного образования NETs выше индуцированного в 3,9 раза. Превышение спонтанного образования NETs выше 16,4% может служить показателем активации РА. У АЦЦП-положительных по сравнению с АЦЦП-негативными пациентами РА выявлена тенденция к повышению интенсивности спонтанного и индуцированного образования NETs.

Заключение. Изучены основные параметры образования NETs и их динамика, ассоциированная с переходом из состояния ремиссии к активному аутоиммунному воспалению у больных РА. На интенсивность образования NETs более выраженное влияние оказывает активность РА, чем наличие АЦЦП. Полученные данные позволяют расширять NETs как новый потенциальный диагностический и прогностический биомаркер.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, нейтрофилы, внеклеточные ловушки нейтрофилов, нетоз, аутоиммунное воспаление, аутоиммунные заболевания.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Бедина СА, Мозговая ЕЭ, Трофименко АС, Мамус МА, Спицина СС, Зборовская ИА. Внеклеточные ловушки нейтрофилов: динамика образования, ассоциированная с переходом от ремиссии к активному ревматоидному артриту. *Сибирское медицинское обозрение.* 2022;(6):86-92. DOI: 10.20333/25000136-2022-6-86-92

Neutrophil extracellular traps: formation dynamics associated with the transition from remission to active rheumatoid arthritis

S. A. Bedina, E. E. Mozgovaya, A. S. Trofimenko, M. A. Mamus, S. S. Spitsyna, I. A. Zborovskaya

Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Volgograd 400138, Russian Federation

The aim of the research. To evaluate the main parameters of neutrophil extracellular traps formation (NETosis) and their dynamics in rheumatoid arthritis (RA) patients associated with the transition from remission to active autoimmune inflammation.

Material and methods. A total of 37 patients (6 males and 31 females) with verified RA according to the ACR/EULAR 2010 criteria were enrolled in the study and formed the main group. The comparison group was constituted by 30 healthy volunteers. Circulating neutrophils were isolated with one-step density gradient centrifugation using double layers of iohexol gradient in the original modification. The quantitative composition of neutrophils was assessed through microscopy of smears stained according to May-Grunwald. Cell viability as well as non-specific activation were evaluated microscopically using trypan blue exclusion assay and nitroblue tetrazolium test, respectively. Neutrophil extracellular trap (NETs) formation was induced by 50 nM phorbol-12-myristate-13-acetate and assessed using fluorescence microscopy.

Results. Neutrophils isolated from RA patients in clinical remission have been revealed to have a higher ability for spontaneous and induced NETs formation than neutrophils from the comparison group. The transition from remission to active RA was characterised by a significant increase in induced and, especially, spontaneous formation of NETs. The growth rate of spontaneous NET formation was 3.9-fold higher than the induced NETs formation. Spontaneous formation of NETs above 16.4 % may serve as a possible RA activation indicator. Neutrophils from ACPA-positive RA patients were found to have increased spontaneous and induced NETs formation compared to ACPA-negative RA patients.

Conclusion. We have studied the main parameters of NETs formation and their dynamics associated with the transition from remission to active autoimmune inflammation in RA patients. The activity of RA has a more pronounced effect on the intensity of NETs formation than the presence of ACPA. NETs may be considered a new potential diagnostic and prognostic biomarker.

Key words: rheumatoid arthritis, neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETs, NETosis, autoimmune inflammation, autoimmune diseases.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Bedina SA, Mozgovaya EE, Trofimenko AS, Mamus MA, Spitsyna SS, Zborovskaya IA. Neutrophil extracellular traps: formation dynamics associated with the transition from remission to active rheumatoid arthritis. *Siberian Medical Review.* 2022;(6):86-92. DOI: 10.20333/25000136-2022-6-86-92

Введение

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся локальным и системным воспалением, при котором тесное взаимодействие между иммунными клетками и медиаторами воспаления приводит к усилению и сохранению процессов воспаления и ремоделирования [1].

В течение последних 30 лет ученые из разных стран Европы, Азии, Северной и Южной Америки проводили эпидемиологические исследования, в рамках которых изучали распространенность и заболеваемость РА. Эти исследования показали, что РА является глобальной проблемой здравоохранения всего мира. Заболевание встречается во многих странах, независимо от расы, этнической принадлежности, национальности, пола и возраста. Вместе с тем, показатели распространенности и заболеваемости варьируют в зависимости от демографических, этнических и других характеристик населения и подвержены изменениям с течением времени. По данным разных авторов распространенность РА в мире находится в пределах от 0,2 до 2 % [2, 3, 4]. Наибольшая распространенность РА зарегистрирована в Аргентине (1,97 %) и Японии (1,7 %), в то же время распространенность данного заболевания в Италии (0,33 %), Франции (0,31 %), Китае (0,28 %), Сербии (0,18 %) находится на низком уровне [5]. Самый высокий уровень заболеваемости РА наблюдается в США (44,6 случая на 100 000 жителей), а самые низкие показатели были зарегистрированы в Японии (8 случаев на 100 000 жителей) и во Франции (8,8 случаев на 100 000 жителей) [5]. При этом, в большинстве исследований выявлена тенденция к росту распространенности и заболеваемости РА, начиная с 1990 г., особенно в таких странах, как Канада, Парагвай и Гватемала. У женщин по сравнению с мужчинами распространенность и заболеваемость РА выше в 3-5 раз. С возрастом эти показатели увеличиваются и достигают максимума в пожилом и старческом возрасте: для женщин – в возрасте 70-74 лет, для мужчин – 75-79 лет. [2, 5]. Некоторые исследования продемонстрировали разные показатели заболеваемости внутри страны, зависящие от региона, и объясняли этот факт влиянием факторов окружающей среды, инфекционных заболеваний, продуктов питания, климатических условий [6]. Кроме того, выявлено, что риск развития РА выше у людей с низким социально-экономическим статусом и проживающих в детстве в сельской местности [5].

Результаты эпидемиологического исследования, проведенного в России, оказались сравнимы с данными зарубежных исследователей. Согласно этим данным, распространенность РА в России составила 0,61 % и оказалась в два раза выше данных официальной статистики [4]. Балабанова Р.М. и соавторы проанализировали динамику заболеваемости РА и его распространенность среди взрослого населения России в целом и отдельно по восьми федеральным округам за пять лет (2013-2017 гг.). В Российской Федерации за анализируемый период

отмечались незначительные ежегодные колебания общей заболеваемости РА и его распространенности (на 100 тыс. населения), при этом в 2014-2015 гг. отмечалось их снижение с последующим ростом в 2016 г. и 2017 г. Незначительный прирост распространения наблюдался в Южном (14,5 %), Северо-Западном (11,7 %), Уральском (9,4 %), Центральном (8,4 %) и Сибирском (8,1 %) федеральных округах. В Дальневосточном (2,25 %) и Приволжском (0,7 %) федеральных округах произошло незначительное уменьшение распространенности РА. Лишь в Северо-Кавказском федеральном округе распространенность заболевания значительно и составила 21,2 %. Анализ возрастного состава больных РА не выявил существенных различий в разных возрастных группах. Отмечалось незначительное преобладание больных РА в старшей возрастной группе (выше 55 лет у женщин и выше 60 – у мужчин) [7].

Клиническая картина РА характеризуется сменой периодов ремиссии и обострения с прогрессирующим поражением суставов, вплоть до необратимого, нарушением их функции, висцеральными поражениями и изменением психологического статуса [8]. Неконтролируемое воспаление при отсутствии лечения разрушает суставы, вызывая их деформацию и инвалидность, а вовлечение в патологический процесс внутренних органов и появление сопутствующих заболеваний на несколько лет сокращает продолжительность жизни больных [9]. Более того, существенные финансовые траты, связанные с госпитализацией, лечением и реабилитацией больных РА, выводят его за рамки медико-социальной проблемы. Нормативное экономическое бремя РА составляет 142,6 млрд. рублей или 471,3 тыс. рублей на 1 человека в год и включает прямые (на оказание медицинской помощи) и косвенные (которые несет общество вследствие утраты пациентом трудоспособности) затраты, связанные с заболеванием. В то же время, исходя из обеспеченности пациентов генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП), реальное экономическое бремя для РА составляет 131,1 млрд руб., а потенциальное – 136,0 млрд рублей [10]. Однако, экономические исследования продемонстрировали, что профилактика РА за счет уменьшения влияния или исключения факторов риска, а так же эффективное лечение заболевания на ранних этапах, значительно уменьшают экономическое бремя РА [5].

Несмотря на то, что в последние годы исследователями был предложен ряд биомолекулярных механизмов возникновения и развития болезни, полностью этиология РА еще не выяснена. Основная текущая гипотеза заключается в том, что нарушение регуляции цитруллинирования приводит к продукции антител к циклическим цитруллинированным белкам (АЦЦП) [5, 11, 12]. В то же время, в последнее десятилетие было проведено множество исследований, в которых подчеркивалась фундаментальная роль нейтрофилов при различных заболеваниях [13]. При этом особое значение в патогенезе множества заболеваний отводилось способности

нейтрофилов к образованию сетчатых структур во внеклеточном пространстве. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) открыты около 25 лет назад и первоначально рассматривались как новый механизм нейтрофилов в борьбе с инфекциями [14]. Однако вскоре после их открытия было обнаружено, что NETs вовлечены в патогенетические механизмы многих аутоиммунных заболеваний, таких, как системная красная волчанка, ANCA-ассоциированный васкулит, РА, псориаз, подагра [15, 16, 17, 18].

Строение и процесс образования ловушек нейтрофилами (NETosis) были подробно описаны Brinkmann et al. [19]. Сети состоят из тонких волокон деконденсированного хроматина, компонентов цитозольного и цитоскелетного происхождения [20]. Образование NETs представляет собой клеточный процесс, который приводит к внеклеточному высвобождению из нейтрофилов сети нуклеиновых кислот, гистонов и гранулярных белков [13]. Компоненты NETs нейтрализуют патогены, попадающие в организм. В то же время, помимо положительных эффектов ловушек, чрезмерное образование NETs вызывает непосредственное повреждение окружающих тканей. Кроме того, являясь источником внеклеточных аутоантигенов, NETs способствуют развитию избыточного иммунного ответа и оказывают провоспалительный эффект, способствуя образованию активных форм кислорода (АФК), секреции цитокинов, взаимодействию модифицированных собственных и чужеродных эпитопов с антигенпрезентирующими клетками, экстернализации аутоантигена, производству антицитруллиновых аутоантител [13, 17, 20, 21].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый нами в понимании процессов формирования NETs, протекающих на молекулярном уровне, остается еще много открытых вопросов, касающихся их точной роли в хроническом воспалении, генетических и эпигенетических факторов и сигнальных путей, участвующих в генерации ловушек. По-прежнему, нет данных, касающихся возможной фармакологической регуляции образования NETs, основанной на ограничении негативных эффектов ловушек и использовании их преимуществ [13]. Отсутствует информация и о динамике скорости образования внеклеточных ловушек нейтрофилами в зависимости от развития обострения РА и от присутствия АЦЦП. Логично предположить, что переход от состояния ремиссии к обострению РА сопровождается и изменением скорости образования NETs, и изменением их количества. С учетом значительных различий иммунопатогенеза АЦЦП-положительного и АЦЦП-негативного РА, весьма вероятно, что данные изменения неодинаковы в указанных подгруппах.

Цель. Оценить основные параметры образования внеклеточных ловушек нейтрофилов (нетоза) и их изменение, ассоциированное с переходом из состояния ремиссии к активному аутоиммунному воспалению у больных РА.

Материал и методы

Исследование проведено в рамках исполнения государственного задания на выполнение работы «Проведение фундаментальных научных исследований» в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации, и рекомендациями по этике биомедицинских исследований, одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (протокол № 1 от 14.11.2016 г.).

Основную группу составили 37 больных РА, удовлетворяющих критериям включения. Среди больных РА было 6 (16 %) мужчин и 31 (84 %) женщина. Средний возраст пациентов составил 42,7 (42,3-43,1) лет, средняя продолжительность заболевания – 1,5 (1,3-1,7) лет. Пациенты, принявшие участие в исследовании находились на амбулаторном лечении в клинко-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» или на стационарном лечении в ревматологическом отделении ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда. Критерии включения в исследование: 1. Возраст от 18 до 70 лет. 2. Верифицированный диагноз РА в соответствии с классификационными критериями ACR/EULAR (2010 г.). 3. Длительность РА ≤ 2 лет. 4. Активность РА ≤ 2,6 баллов по шкале DAS28. 5. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: 1. Отказ больных от участия в исследовании. 2. Другие системные аутоиммунные заболевания: системная красная волчанка, системная склеродермия, идиопатические воспалительные миопатии, системные васкулиты, болезнь Шегрена. 3. Сахарный диабет. 4. Злокачественные новообразования. 5. Хроническая болезнь почек IV-V стадии. 6. Цирроз печени.

Все пациенты РА были обследованы однократно при обращении на амбулаторный прием или при поступлении в стационар. Всем больным проводилось полное клинко-лабораторное обследование и рентгенография пораженных суставов. Для дальнейшего наблюдения отбирали пациентов с РА, соответствующих критериям включения в исследование. После включения в исследование и отбора первоначального образца крови пациентам с РА выполнялась повторная клинко-лабораторная оценка активности заболевания с четырехмесячным интервалом в течение года, т. е. через 4 (1-й контрольный визит), 8 (2-й контрольный визит) и 12 (3-й контрольный визит) месяцев от момента включения в исследование (0-й визит). При повышении DAS28 более 3,2 баллов в течение всего срока наблюдения производился повторный отбор образца крови для исследования. Референтную группу составили 30 здоровых лиц (21 женщина и 9 мужчин, средний возраст – 37,2 лет) – доноров отделения переливания крови ГБУЗ «ГКБСМП № 25».

Нейтрофилы периферической крови выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола в оригинальной модификации [22]. Венозную кровь отбирали в силиконированные пробирки

с антикоагулянтом (ЭДТА). Кровь и 0,02 М трис-HCl буфер с рН 7,4 смешивали в равных объемах. Для приготовления градиентов использовали Йогексол TP350 (Мосфарм, Россия). Ступенчатый градиент плотности йогексола с осмолярностью 340-370 мОсм/л имел следующий состав: верхний слой с плотностью 1080 кг/м³ и нижний слой с плотностью 1090 кг/м³. Градиенты (по 2 мл) и разбавленную кровь (4 мл) последовательно наслаивали в центрифужные пробирки, предварительно силиконированные. Центрифугирование проводили 40 минут при 400g и температуре 20±1 °С. Для последующего анализа из нижней интерфазы (на границе слоя с плотностью 1080 кг/м³ и слоя с плотностью 1090 кг/м³) отбирали нейтрофилы, включающие, преимущественно фракции средней и низкой плотности. Наиболее плотные фракции нейтрофилов не выделяли ввиду неизбежной контаминации их эозинофилами и эритроцитами. Далее нейтрофилы отмывали от градиента и примеси тромбоцитов в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) и двукратно центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Необходимую концентрацию суспензии получали, разбавляя ее в среде RPMI-1640. При значительном загрязнении эритроцитами проводили их бикарбонатно-аммонийный гипотонический лизис. Качественный состав лейкоцитарных фракций оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, окрашенных по методу Май-Грюнвальда. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего, степень активации – с помощью стандартного теста с нитросиним тетразолием.

Для оценки образования NETs 1×10^5 нейтрофилов инкубировали в течение 3 часов при 37 °С в 100 мкл среды RPMI-1640 в 96-луночном планшете (определение спонтанного уровня образования ловушек) и в присутствии стимулятора образования NETs – 50 нМ раствора форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА) (Merck/Sigma, США) (определение уровня индуцированного образования ловушек нейтрофилами). После чего клетки отмывали, фиксировали в 100 мкл 4 % параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре и вновь отмывали от фиксатора. Визуализировали NETs с помощью флуоресцентной микроскопии (длина волны возбуждения 485 нм, эмиссии – 535 нм) после инкубации нейтрофилов в 100 мкл 1,25 мкМ SYBR Green в течение 10 мин. За внеклеточные ловушки нейтрофилов принимали четко определяемые, расположенные внеклеточно структуры, значительно превышающие размер интактных гранулоцитов. Результат выражали в процентах, как относительное количество нейтрофилов с внеклеточными ловушками на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации в образце не менее 200 клеток. АЦЦП определяли ИФА с использованием коммерческих наборов (Orgentec Diagnostika GmbH, Германия), в соответствии инструкцией, учитывая приведенный в ней референтный интервал (до 20 ед./мл).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы «STATISTICA

10.0» для Windows. Тип распределения анализировали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты выражали как среднее арифметическое (95 % доверительный интервал) (М (95 % ДИ)). Верхние границы ДИ, превышающие 100 %, усекали до 100 %. Для сопоставления центральных тенденций использовали парный и непарный критерии Стьюдента. Статистически значимыми считали различия центральных тенденций при неперекрывающихся 95 % ДИ и при уровне значимости $p < 0,05$. Расчет темпа прироста показателей спонтанного и индуцированного образования нейтрофильных ловушек при увеличении DAS28 > 3,2 по сравнению с предыдущим визитом производился по формуле: (конечное значение – исходное значение)/исходное значение $\times 100$ %.

Результаты и обсуждение

За период исследования 37 пациентов прошли 1-й, 31 – 2-й и 23 – 3-й контрольный визит (спустя 3, 8 и 12 месяцев после включения в исследование, соответственно). 2 пациента выбыли на 2 визите и 3 пациента – на 3 визите по причине их отказа от дальнейшего участия в исследовании. Помимо этого, общее количество больных при последующих визитах уменьшалось за счет пациентов с активизацией заболевания, которые дальнейшему наблюдению не подвергались. В результате динамического контроля активности РА зарегистрировано 16 (15 %) случаев активизации РА с увеличением значения DAS28 до определенного критериями включения уровня (7 случаев на третьем визите, 5 – на втором, 4 – на первом). АЦЦП были обнаружены у 29 из 37 пациентов с РА (78 %). Среди 16 больных с активным РА АЦЦП выявлены у 12 (75 %).

Нейтрофильные фракции, выделенные из периферической крови лиц, включенных в исследование (как референтной группы, так и группы больных РА) в процессе одноэтапного центрифугирования в ступенчатом градиенте йогексола в нашей модификации, демонстрировали высокую чистоту и большое содержание жизнеспособных неактивированных клеток. Увеличение плотности верхнего слоя градиента (по сравнению с обычно используемым градиентом с плотностью 1077 кг/м³) способствовало предотвращению попадания мононуклеаров во фракцию нейтрофилов, а уменьшение плотности нижнего слоя градиента предотвращало попадание в выделяемую фракцию эозинофилов и эритроцитов. Кроме того, использование йогексола обеспечивало упрощение манипуляций по титрованию основных параметров градиентов до целевых значений.

Основные показатели фракций нейтрофилов референтной группы и группы больных РА на всех этапах исследования представлены на рисунке 1.

Как следует из рисунка, показатели выхода нейтрофилов, чистоты нейтрофильных фракций, средней доли жизнеспособных и неактивированных клеток практически не отличались в обеих группах. В некоторых образцах нейтрофилов присутствовало незначительное (менее 3%) количество примесей (эритроцитов

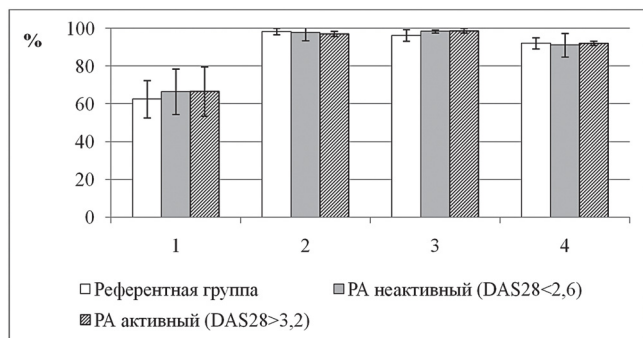


Рисунок 1. Основные показатели нейтрофилов в референтной группе и группе больных РА на этапе включения в исследование и при активации заболевания (M (95 %ДИ)).

Примечание. (1) Выход нейтрофилов. (2) Чистота нейтрофилов. (3) Жизнеспособность нейтрофилов. (4) Неактивированные нейтрофилы.

Figure 1. Main neutrophilic parameters both in the comparison and the RA group at the enrolment point and after disease activation (M (95 % CI)).

Note: (1) Neutrophil release. (2) Neutrophil purity. (3) Neutrophil viability. (4) Non-activated neutrophils.

и эозинофилов). Следует отметить, что, у больных РА отмечался несущественный рост выхода нейтрофилов на фоне снижения чистоты нейтрофильных фракций за счет увеличения доли эритроцитов в образцах крови, отобранной у больных РА с анемией.

Обнаружено, что спонтанное образование нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных неактивным и активным РА выше, чем в референтной группе ($p = 0,0014$ и $p < 0,0001$, соответственно; непарный критерий Стьюдента). Применение ФМА как в референтной группе, так и в группе больных РА сопровождалось ростом числа нейтрофилов, находящихся в процессе нетоза и генерирующих NETs, причем даже у больных с неактивным РА этот показатель был значительно выше по сравнению с лицами, входящими в референтную

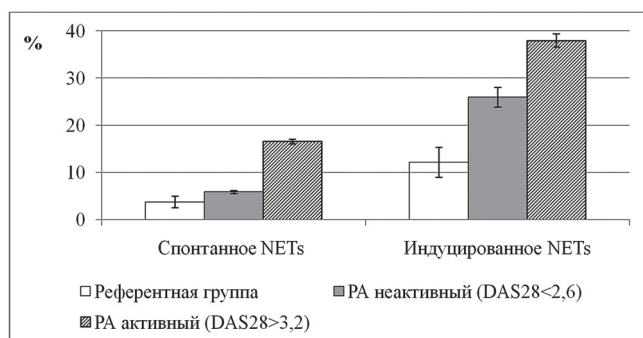


Рисунок 2. Динамика спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных РА при увеличении DAS28 and $gt; 3,2$ (M (95 % ДИ)).

Figure 2. Dynamics of spontaneous and induced neutrophil extracellular traps formation in RA patients with DAS28 $gt; 3.2$ increase (M (95 % CI)).

группу (для всех различий $p < 0,0001$, непарный критерий Стьюдента). У больных с активным РА (DAS28 $> 3,2$) доля спонтанного и индуцированного образования ловушек нейтрофильными клеточными фракциями выше по сравнению с пациентами с неактивным РА (DAS28 $< 2,6$) ($p < 0,0001$, парный критерий Стьюдента для всех случаев). На рисунке 2 представлена динамика спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилами у больных РА при переходе из стадии ремиссии в стадию активного воспаления и увеличения DAS28 $> 3,2$. Согласно этим данным, в нейтрофильной фракции темп прироста спонтанного образования ловушек выше индуцированного в 3,9 раза (рис. 3).

Частота спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек для нейтрофилов больных с активным РА, позитивных по АЦЦП, имела некоторую тенденцию к повышению по сравнению с образцами других пациентов. Так, средняя частота спонтанного и индуцированного образования NET для больных РА, позитивных по АЦЦП, составила 17,0 (16,6-17,4) и 39,2 (38,0-40,4) %, соответственно; для АЦЦП- негативных больных РА – 16,4 (15,9-16,9) и 37,1 (35,5-38,7) %, соответственно. Корректное вычисление статистической значимости различий показателей ловушкообразования в группах больных, позитивных и негативных по АЦЦП, не представляется возможным из-за недостаточного количества наблюдений в группе больных РА, негативных по АЦЦП.

Таким образом, использование модифицированного нами протокола выделения нейтрофилов позволяет получить более точные результаты в отношении NETs, которые менее подвержены влиянию артефактов, в особенности – контактной активации в ходе выделения клеток. В то же время, результаты наших исследований соотносятся с данными других работ: все исследования, посвященные изучению интенсивности образования внеклеточных ловушек нейтрофилами, демонстрируют повышенный спонтанный и индуцированный нетоз для

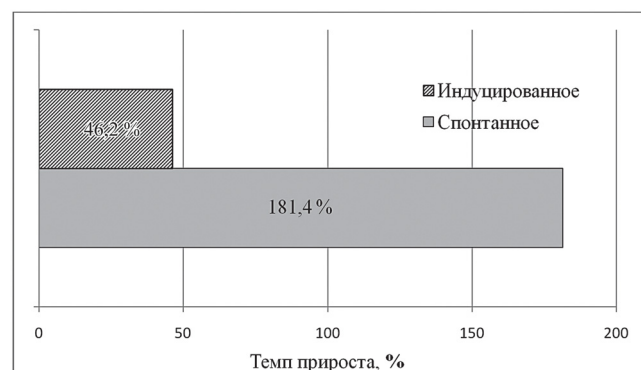


Рисунок 3. Темп прироста спонтанного и индуцированного образования NET у больных РА.

Figure 3. Growth rate of spontaneous and induced formation in RA patients.

нейтрофилов, выделенных у больных РА [15, 23]. Однако, в отличие от нашего исследования, в большинстве работ способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек изучалась у больных с активным РА. В то время, как мы показали зависимость параметров образования сетей от периода заболевания. В целом, на фоне активизации РА наблюдается статистически значимое увеличение спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилами по сравнению с показателями пациентов без существенного прироста активности РА. Активация спонтанной генерации нейтрофильных ловушек может свидетельствовать об образовании NETs у больных РА *in vivo* и участии нетоза в патогенезе заболевания, что подтверждается работами зарубежных авторов [16]. Кроме этого, обнаружена тенденция к некоторому повышению интенсивности как спонтанного, так и ФМА-индуцированного образования NETs у больных РА с наличием АЦЦП по сравнению с АЦЦП-негативными пациентами. Тем не менее, влияние активности РА на интенсивность образования внеклеточных ловушек представляется более выраженным, чем наличие АЦЦП-позитивности.

Заключение

Таким образом, мы изучили основные параметры образования внеклеточных ловушек нейтрофилами у больных РА вне обострения и их динамику при переходе из состояния ремиссии к активному аутоиммунному воспалению. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, по сравнению с группой здоровых лиц, у больных РА в состоянии ремиссии способность нейтрофилов к спонтанному образованию ловушек выше в 1,6 раз, а к индуцированному – в 2,1 раза. Активизация аутоиммунного воспаления при РА сопровождается дальнейшим и весьма значительным ростом образования нейтрофильных внеклеточных ловушек, в особенности спонтанного. Увеличение спонтанного образования NETs выше 16,4 % может служить показателем активации аутоиммунного воспалительного процесса у больных РА и перехода из состояния ремиссии в активную фазу. Активность аутоиммунного ревматоидного процесса, по-видимому, оказывает более значимое влияние на скорость и интенсивность образования внеклеточных сетей периферическими нейтрофилами по сравнению с наличием АЦЦП у больных РА. Определение способности нейтрофилов к генерации NETs и их визуализация имеет определенные перспективы в качестве диагностического и прогностического инструмента для диагностики РА на раннем этапе заболевания и для контроля за состоянием больных, а также для оценки эффективности терапии. Дополнительные исследования, направленные на расшифровку конкретных механизмов формирования NETs, создадут возможности для разработки новых препаратов, обеспечивающих медикаментозный контроль образования нейтрофильных ловушек, направленный на ограничение негативного влияния NETs и использование их преимуществ,

что предоставит клиницистам возможность проводить таргетную иммунотерапию, основанную на управлении функциональными возможностями нейтрофилов.

Литература / References

1. Testa D, Calvacchi S, Petrelli F, Giannini D, Bilia S, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2021: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2021;39(3):445-52.
2. Safri S, Kolahi AA, Hoy D, Smith E, Bettampadi D, Mansournia MA, Almasi-Hashiani A, Ashrafi-Asgarabad A, Moradi-Lakeh M, Qorbani M, Collins G, Woolf AD, March L, Cross M. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: A systematic analysis of the global burden of disease study 2017. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019;78:1463–71. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215920
3. Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020;9(4):880. DOI: 10.3390/cells9040880
4. Галушко ЕА., Насонов ЕЛ. Распространенность ревматических заболеваний в России. Альманах клинической медицины. 2018;46(1):32–9. [Galushko EA, Nasonov EL. Prevalence of rheumatic diseases in Russia. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(1):32–9. (In Russian)] DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-1-32-39
5. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. 2021;10(11):2857. DOI: 10.3390/cells10112857.
6. Taylor-Gjevre R, Nair B, Jin S, Quail J. Geographic variation in incidence and prevalence rates for rheumatoid arthritis in Saskatchewan, Canada 2001–2014. *Canadian Journal of Public Health*. 2018; 109(3):427–35. DOI: 10.17269/s41997-018-0045-6
7. Балабанова РМ., Дубинина ТВ. Динамика пятилетней заболеваемости болезнями костно-мышечной системы и их распространенности среди взрослого населения России за 2013–2017 гг. *Современная ревматология*. 2019;13(4):11-7. [Balabanova RM, Dubinina TV. Five-year (2013–2017) trends in the incidence and prevalence of musculoskeletal system diseases among the adult population of Russia. *Modern Rheumatology Journal*. 2019;13(4):11-7. (In Russian)] DOI: 10.14412/1996-7012-2019-4-11-17
8. Chaurasia N, Singh A, Singh IL, Singh T, Tiwari T. Cognitive dysfunction in patients of rheumatoid arthritis. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2020;9(5):2219–25. DOI: 10.4103/jfmprc.jfmprc_307_20
9. Lassere M.N, Rappo J, Portek IJ, Sturgess A, Edmonds JP. How many life years are lost in patients with rheumatoid arthritis? Secular cause-specific and all-cause mortality in rheumatoid arthritis, and their predictors in a long-term Australian cohort study. *Internal Medicine Journal*. 2013;43(1):66–72. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2012.02727.x
10. Ли́ла АМ, Древалёв РО, Шипицын ВВ. Оценка организации медицинской помощи и лекарственного обеспечения при ревматических заболеваниях и социально-экономического бремени этих болезней в Российской Федерации. *Современная ревматология*.

2018;12(3):112-9. [Lila AM, Dreval RO, Shipitsyn VV. Assessment of organization of medical care and drug provision for patients with rheumatic diseases, and the socioeconomic burden of these diseases in the Russian Federation. *Modern Rheumatology Journal*. 2018;12(3):112-9. (In Russian)] DOI: 10.14412/1996-7012-2018-3-112-119

11. Kurowska W, Kuca-Warnawin EH, Radzikowska A, Maśliński W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Central European Journal of Immunology*. 2017;42(4):390-8. DOI: 10.5114/ceji.2017.72807

12. Kongpachith S, Lingampalli N, Ju CH, Blum LK, Lu DR, Elliott SE, Mao R, Robinson WH. Affinity Maturation of the Anti-Citrullinated Protein Antibody Paratope Drives Epitope Spreading and Polyreactivity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2019;71(4):507-17. DOI: 10.1002/art.40760

13. Wigerblad G, Kaplan MJ. NETs spread ever wider in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 2020;16(2):73-4. DOI: 10.1038/s41584-019-0352-1

14. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-35. DOI:10.1126/science.1092385

15. de Bont CM, Stokman MEM, Faas P, Thurlings RM, Boelens WC, Wright HL, Pruijn GJM. Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2020;(113):102484 DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102484

16. Song W, Ye J, Pan N, Tan C, Herrmann M. Neutrophil Extracellular Traps Tied to Rheumatoid Arthritis: Points to Ponder. *Frontiers in Immunology*. 2021; 11:578129. DOI: 10.3389/fimmu.2020.578129

17. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2021;61(2):194-211. DOI: 10.1007/s12016-020-08804-7

18. d'Alessandro M, Conticini E, Bergantini L, Cameli P, Cantarini L, Frediani B, Bargagli E. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis and Interstitial Lung Disease: A Scoping Review. *Life (Basel)*. 2022;12(2):317. DOI: 10.3390/life12020317

19. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*. 2012;198(5):773-83. DOI: 10.1083/jcb.201203170

20. Trofimenko AS, Mozgovaya EE, Bedina SA, Spasov AA. Ambiguities in Neutrophil Extracellular Traps. Ongoing Concepts and Potential Biomarkers for Rheumatoid Arthritis: A Narrative Review. *Current Rheumatology Reviews*. 2021;17(3):283-93. DOI: 10.2174/1573397116666201221113100

21. Dömer D, Walther T, Möller S, Behnen M, Laskay T. Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. *Frontiers in Immunology*. 2021;(12):636954. DOI: 10.3389/fimmu.2021.636954

22. Патент РФ на изобретение № 2739324/22.12.2020. Бюл. № 36. Мамус МА, Тихомирова ЕА, Трофименко АС,

Бедина СА, Мозговая ЕЭ, Спицина СС, Зборовская ИА. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из крови с использованием двухступенчатого градиента плотности йогексола. Ссылка активна на 04.05.2022 [Patent RU № 2739324/ December 22, 2020. Bull. № 36. Mamus MA, Tihomirova EA, Trofimenko AS, Bedina SA, Mozgovaya EE, Spitsyna SS, Zborovskaya IA. Method for recovering neutrophilic granulocytes from blood using two-step density gradient of iohexol. Accessed May 04, 2022. (In Russian)]

23. Wu S, Peng W, Liang X, Wang W. Anti-citrullinated protein antibodies are associated with neutrophil extracellular trap formation in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021; 35(3):e23662. DOI: 10.1002/jcla.23662

Сведения об авторах

Бедина Светлана Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)789095; e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5316-0185>

Мозговая Елена Эдуардовна, к.м.н., ведущий научный сотрудник, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)789095; e-mail: nauka@pebma.org, <https://orcid.org/0000-0002-5316-0185>

Трофименко Андрей Степанович, к.м.н., заведующий клинико-биохимической лабораторией, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)789095; e-mail: a.s.trofimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1627-8483>

Мамус Мария Анатольевна, младший научный сотрудник, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)789095; e-mail: m.mamus@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5488-1451>

Спицина Светлана Сергеевна, младший научный сотрудник, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)789095; e-mail: svetlanahime@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5127-611X>

Зборовская Ирина Александровна, д.м.н., профессор, директор, научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А. Б. Зборовского; адрес: Российская Федерация, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки 76; тел.: +7(8442)78-90-95; e-mail: pebma@pebma.org, <https://orcid.org/0000-0003-3898-7667>

Author information

Svetlana A. Bedina, Cand.Med.Sci., senior researcher, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5316-0185>

Elena E. Mozgovaya, Cand.Med.Sci., leading researcher, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: nauka@pebma.org, <https://orcid.org/0000-0003-0373-5072>

Andrey S. Trofimenko, Cand.Med.Sci., head of department, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: a.s.trofimenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1627-8483>

Mariya A. Mamus, junior researcher, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: m.mamus@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5488-1451>

Svetlana S. Spitsyna, junior researcher, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: svetlanahime@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5127-611X>

Irina A. Zborovskaya, Dr. Med. Sci., professor, head of the Research Institute, Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy, Address: 76, Zemlyachki str., Volgograd, Russian Federation 400138; Phone: +7(8442)789095; e-mail: pebma@pebma.org, <https://orcid.org/0000-0003-3898-7667>

Дата поступления 04.05.2022

Дата рецензирования 06.08.2022

Принята к печати 03.11.2022

Received 04 May 2022

Revision Received 06 August 2022

Accepted 03 November 2022