

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

¹Бедина С.А., ¹Трофименко А.С., ¹Мамус М.А., ¹Тихомирова Е.А., ¹Мозговая Е.Э.,
¹Спицина С.С., ²Девятаева Н.М.

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;

²Государственное автономное профессиональное образовательное учреждение «Волгоградский медицинский колледж», Волгоград

Изучена способность нейтрофилов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек у больных ревматоидным артритом (РА). В исследование были включены 25 пациентов с верифицированным диагнозом РА в соответствии с критериями ACR / EULAR 2010 и 30 практически здоровых людей. Выделение нейтрофилов проводили одноэтапным центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-амидотризоата с плотностью верхнего и нижнего градиентов 1080 и 1090 кг/м³ соответственно. Качественный состав нейтрофильной фракции оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, степень активации нейтрофилов оценивали при помощи стандартного теста с нитросиним тетразолием. Стимуляция образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) выполнялась путем инкубации с форбол-12-миристат-13-ацетатом. Интенсивность образования NETs регистрировали методом флуоресцентной микроскопии с SYBR green. Чистота фракции нейтрофилов при РА составила 93,3%, доля жизнеспособных клеток превышала 95%. В группе больных РА и у здоровых лиц наблюдалось спонтанное образование NETs. У больных РА выраженность спонтанного и индуцированного образования нейтрофильных внеклеточных ловушек существенно выше по сравнению со здоровыми лицами. Частота спонтанного и индуцированного ловушкообразования для нейтрофилов больных РА, позитивных по АЦА, имела некоторую тенденцию к повышению по сравнению с образцами других пациентов.

Ключевые слова: нейтрофил, внеклеточные ловушки нейтрофилов, нетоз, ревматоидный артрит, аутоиммунные заболевания.

FORMATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

¹Bedina S.A., ¹Trofimenko A.S., ¹Mamus M.A., ¹Tikhomirova E.A., ¹Mozgovaya E.E.,
¹Spitsina S.S., ²Devyataeva N.M.

¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy», Volgograd, e-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru;

²The Volgograd Medical College, Volgograd

The ability of peripheral blood neutrophils to spontaneous and induced formation of extracellular traps in patients with rheumatoid arthritis (RA) was studied. The study included 25 patients with verified RA according to the ACR/EULAR 2010 criteria and 30 healthy people. Neutrophils were isolated with one-step centrifugation procedure using double-layer ficoll-amidotriazoate density gradient with density of upper and lower layers 1080 kg/m³ and 1090 kg/m³, respectively. The types of cells in the resulting fractions were identified by means of light microscopy, the extent of neutrophil activation was measured using common nitro-blue tetrazolium test. The generation of neutrophil extracellular trap (NETs) was stimulated by phorbol-12-myristate-13-acetate. The shape and size of NETs was assessed using fluorescence microscopy with SYBR green. Mean purity of neutrophil fraction in RA group was 93.3%, cell viability in every sample was above 95%. Spontaneous NET formation was observed in neutrophils isolated from RA patients and healthy controls. Spontaneous and induced NETosis in RA patients was significantly increased comparing to healthy controls. Neutrophils from ACPA-positive RA patients demonstrated increased spontaneous and induced NETs formation compared from ACPA- negative RA patients.

Keywords: neutrophil, neutrophil extracellular trap, NETosis, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases.

Ревматоидный артрит (РА) - хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением синовиальных тканей и необратимым повреждением хряща

и кости в синовиальных суставах, на развитие которого влияют как генетические факторы, так и факторы окружающей среды. Заболевание сопровождается хронической болью, функциональной несостоятельностью суставов и инвалидностью пациентов. Распространенность РА составляет около 1% и в два-три раза чаще встречается у женщин, чем у мужчин.

За последние 50 лет концепция роли иммунной системы в патогенезе РА значительно изменилась [1]. Доказано участие нейтрофилов в возникновении и развитии ряда аутоиммунных заболеваний, в том числе и РА. При РА нарушается регуляция активации нейтрофилов, включая выработку цитокинов и активных форм кислорода, экспрессию генов и апоптоз. У больных РА апоптоз нейтрофилов (особенно в суставах) задерживается, и активированные нейтрофилы в синовиальных тканях и синовиальной жидкости высвобождают цитотоксические протеазы, которые повреждают хрящ. Кроме этого, нейтрофилы участвуют в развитии аутоиммунитета при РА через производство нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) и экстернализацию внутриклеточных неоэпитопов, например цитруллинированных пептидов.

Внеклеточные ловушки нейтрофилов представляют собой трехмерные хроматин-содержащие структуры, выделяющиеся нейтрофилами в ответ на инфекционные или воспалительные агенты в процессе запрограммированной клеточной гибели NETosis [2]. Основными компонентами NETs являются ДНК, гистоны, ферменты и белки гранул (нейтрофильная эластаза, миелопероксидаза, катепсин G, лактоферрин, желатиназа, лизоцим C, кальпротектин, лейкоцитарная протеиназа и другие). С NETs также связаны некоторые белки цитоскелета: актин и тубулин.

Впервые ловушки были описаны в 2004 году V. Brinkmann с соавторами как альтернативный защитный механизм, с помощью которого нейтрофилы захватывают и, возможно, убивают микробы [2]. Последующие исследования подтвердили это предположение. NETs могут принимать различные формы и превышать в 10-15 раз объем высвобождающей их клетки.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные NETs и опубликованные за последние 15 лет, мы все еще мало знаем о механизмах их образования. В настоящее время идентифицированы индукторы образования NETs, включающие физиологические и нефизиологические молекулы, а также микроорганизмы (грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, грибы и простейшие). Наиболее мощными нефизиологическими индукторами NETsis *in vitro* являются форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), суперактиватор протеинкиназы C, ионофоры кальция (иономицин и A23187). К физиологически значимым индукторам относятся: N-формилметионил-

лейцил-фенилаланин, интерлейкин-8, липополисахарид, оксид азота и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), компоненты системы комплемента, активированные тромбоциты, пероксид водорода, аутоантитела, кристаллы уратов, сигаретный дым [2]. Физиологическая индукция NETosis связана с toll-подобными рецепторами, но она также может быть индуцирована ионофорами, такими как A23187 и нигерицин.

Наиболее подробно изучен ФМА-индуцированный NETosis, при котором идентифицирован ряд молекулярных процессов, приводящих к образованию сети. ФМА связывается с протеинкиназой C, кальций высвобождается из внутриклеточных хранилищ, и активируется путь Raf-МЕК-ERK. Затем на фагосомальной мембране собирается мультимерный комплекс НАДФН-оксидазы и генерируются активные формы кислорода. NETosis, для которого необходима активация НАДФН-оксидазы и генерация активных форм кислорода, получил название «NOX2-зависимый NETosis». Активные формы кислорода увеличивают проницаемость мембран, приводя к высвобождению нейтрофильной эластазы, а впоследствии и миелопероксидазы из азурофильных гранул в ядро. Нейтрофильная эластаза сначала разрушает гистоны линкера H1, а затем гистоны ядра и приводит к деконденсации хроматина. Последующее связывание миелопероксидазы с хроматином усиливает его деконденсацию, причем независимо от активности энзима. Детали молекулярного механизма транслокации ферментов из гранул в ядро остаются неизвестными на данный момент [3].

Важную роль в NETosis играет также Ca^{2+} -зависимый фермент - пептидиларгининдеиминаза 4 (PAD4), которая способствует превращению положительно заряженных аргининовых остатков гистонов в электрически нейтральный цитруллин [4]. Однако каким образом происходит ее активация, не известно. Rohrbach A.S. с соавторами было высказано предположение, что активация НАДФН-оксидазы также может быть предпосылкой для активации PAD4. НАДФН-оксидаза регулирует генерацию активных форм кислорода и повышение внутриклеточного уровня кальция, который необходим для активации PAD4 [5]. В результате этих событий происходит деконденсация хроматина, ядра округляются и расширяются, ядерная оболочка распадается на везикулы, гранулы и митохондрии распадаются. Цитоплазма и кариоплазма смешиваются, цитоскелетные структуры сокращаются и, наконец, клеточная мембрана разрывается и высвобождает клеточное содержимое, которое разворачивается во внеклеточном пространстве с образованием сетеподобной структуры.

Таким образом, в деконденсации хроматина в нейтрофильных гранулоцитах важную роль играет гиперцитруллинация гистонов, а образование аутоантител к цитруллинированным антигенам, по современным представлениям, считается ключевым моментом в патогенезе РА. Поскольку основным источником цитруллинированных белков являются NETs, следовательно, они также участвуют в патогенезе заболевания. В свою очередь, антицитруллиновые антитела и воспалительные цитокины (IL-8, IL-17A, TNF- α) стимулируют NETosis. В результате этих событий замыкается порочный круг генерации цитруллинированных аутоантигенов и индукции аутоиммунных реакций при РА [6].

В ревматологической практике в настоящее время в качестве диагностического маркера РА широкое применение получило определение антицитруллиновых антител. Однако данный метод имеет ряд существенных недостатков: чувствительность всех известных типов антицитруллиновых антител не превышает 83%, а уровень антицитруллиновых антител в большей степени коррелирует с ревматоидным фактором и острофазовыми белками, чем с активностью заболевания, что не позволяет использовать антицитруллиновые антитела для оценки эффективности лечения [7].

На данный момент совершенствование диагностики РА главным образом направлено на поиск и валидацию новых биомаркеров, что особенно важно в свете тенденции к персонализации терапии ревматических заболеваний [7]. В связи с этим изучение функциональных особенностей нейтрофильных гранулоцитов остается перспективным направлением в области улучшения диагностики и поиска новых «мишеней» для избирательного терапевтического воздействия.

Цель исследования: изучить интенсивность спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек нейтрофилами периферической крови у больных РА.

Материал и методы исследования

В исследование включены 25 больных (18 женщин, 7 мужчин) ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» и пациенты ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» с верифицированным диагнозом РА при помощи критериев ACR/EULAR 2010 [8]. Средний возраст составил $51,4 \pm 4,5$ года, средняя продолжительность заболевания - $2,3 \pm 0,8$ года. На момент включения больных активность РА по DAS28 [8] была не более 2,6 балла. Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду были выявлены у 15 пациентов с РА (60%). В референтную группу вошли 30 (21 женщина, 9 мужчин, средний возраст 38,2 года) практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

Выделение нейтрофилов производили из венозной крови с этилендиаминтетрауксусной кислотой одноэтапным центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-амидотризоата с плотностью верхнего и нижнего градиентов 1080 и 1090 кг/м³ соответственно при 700 g и 20±1 °С в течение 15 мин. Для выделения клеток использовали самостоятельно приготовленные градиенты фиколла-амидотризоата, что позволило контролировать наиболее важные параметры градиента: плотность, рН, осмолярность в оптимальном диапазоне значений, и при необходимости подвергать их коррекции, что обеспечивало высокую степень чистоты нейтрофильной фракции, увеличивало жизнеспособность клеток и уменьшало их неспецифическую активацию. Все градиенты имели расчетную осмолярность в пределах 280-320 мосм/л, рН 7,2-7,4. Нейтрофилы собирали с нижней интерфазы. После этого двукратно отмывали клетки от градиента и тромбоцитов в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе, центрифугируя их при 1500 об./мин. в течение 20 мин. в силиконированных пробирках. Разбавление суспензии до нужной концентрации выполняли в среде RPMI-1640.

Определение чистоты выделения нейтрофилов проводилось с помощью окрашивания мазка клеточной суспензии по Май-Грюнвальду. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания трипановым синим по общепринятому протоколу с последующим подсчётом как абсолютного числа клеток, так и процентного содержания жизнеспособных нейтрофилов. Степень активации нейтрофилов оценивали при помощи стандартного теста с нитросиним тетразолием.

Стимуляция образования внеклеточных ловушек выполнялась при помощи раствора форбол-12-миристан-13-ацетата (AppliChem, Испания) в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе с конечной концентрацией 50 нМ в течение 3 часов при 37 °С. Контроль спонтанного уровня NET выполнялся таким же образом, с заменой форбол-12-миристан-13-ацетата на стерильный фосфатно-солевой буферный раствор.

Интенсивность образования ловушек регистрировали методом флуоресцентной микроскопии с SYBR green с длиной волны возбуждения 485 нм и эмиссией – 535 нм. Ловушками считали четко определяемые внеклеточные сети с двойной флуоресценцией, превосходящие размер интактных клеток. Результат выражали в процентах как относительное количество клеток с ловушками на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации не менее 200 клеток в образце.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0. Результаты выражали как среднее арифметическое (95% доверительный интервал (ДИ)). Для качественных показателей доверительный интервал

рассчитывали при помощи биномиального метода. Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100,0%. Для анализа различий качественных показателей применяли критерий Макнемара или точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты комплексной оценки основных параметров нейтрофилов в группе здоровых лиц и у пациентов с РА представлены в таблице.

Основные параметры выделяемых нейтрофильных клеточных фракций у здоровых лиц и у больных РА

Параметры нейтрофилов	Здоровые (М (95%ДИ))	Больные РА (М (95%ДИ))	P
Средний выход выделенных клеток, %	53,5 (46,4-60,6)	57,1 (52,2-62,0)	>0,05
Средняя чистота клеточных фракций, %	97,5 (90,3-100,0)	93,1 (87,0-99,2)	>0,05
Средняя доля жизнеспособных клеток, %	94,9 (90,2-99,6)	95,4 (90,3-100,0)	>0,05
Средняя доля неактивированных клеток, %	94,2 (91,1-97,3)	92,3 (83,8-100,0)	>0,05
Средняя доля спонтанного образования NET, %	3,2 (2,0-4,4)	7,7 (5,9-9,5)	<0,05
Средняя доля индуцированного образования NET, %	11,6 (9,5-13,7)	24,4 (17,6-31,2)	<0,05

Из данных таблицы видно, что в референтной группе во фракции нейтрофилов наблюдалось менее 3% примесей, в основном за счет эозинофилов и незначительного числа эритроцитов в отдельных образцах.

У больных РА, по сравнению с референтной группой, отмечалось некоторое увеличение выхода нейтрофилов вместе с увеличением доли клеточных примесей (табл.), преимущественно за счет эритроцитов. Данное явление было выражено в большей степени у 3 пациентов с выраженной анемией. По-видимому, такая особенность связана со снижением относительной плотности эритроцитов и, как следствие, с искажением их седиментационных характеристик. Тем не менее чистота нейтрофильной фракции у таких больных оставалась достаточной для выполнения последующих этапов при условии повышения интенсивности центрифугирования до 700 g. Значения жизнеспособности и неспецифической активации нейтрофилов по результатам теста с нитросиним тетразолием не демонстрировали существенных различий между здоровыми лицами и пациентами с РА.

Средняя доля нейтрофилов со спонтанным ловушкообразованием у больных РА была существенно выше по сравнению со здоровыми лицами (табл.). Частота спонтанного ловушкообразования для нейтрофилов больных РА, позитивных по антицитруллиновым антителам, имела некоторую тенденцию к повышению по сравнению с образцами других пациентов. После применения индукторов ловушкообразования доля нейтрофилов, образующих ловушки, существенно увеличивалась, при этом степень увеличения при неактивном РА также была отчетливо выше по сравнению с нормой ($p < 0,05$).

Морфология внеклеточных ловушек при световой и люминесцентной микроскопии нейтрофилов здоровых лиц и больных РА не демонстрировала существенных межиндивидуальных различий в отношении размеров, формы и содержания ДНК.

Полученные нами экспериментальные данные подтверждают усиленное образование внеклеточных ловушек циркулирующими нейтрофилами, выделенными из периферической крови больных РА [6]. За последние 20-30 лет, благодаря использованию новых технологий, наши знания в области функционирования иммунной системы при различных патологиях (в том числе и при РА) претерпели серьезные изменения [9]. Значительно расширилось представление о спектре функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов и молекулярных механизмах их реализации. В том числе была обнаружена способность нейтрофилов к образованию NETs и доказана их роль в формировании аутоиммунитета при РА.

Заключение

Таким образом, нами изучено образование внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных РА и у здоровых лиц, образующих референтную группу. Показано, что у больных РА, в особенности у пациентов с наличием антицитруллиновых антител, выраженность спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек существенно повышена. Это дает возможность рассмотрения NETs в качестве потенциального биомаркера РА, а также раскрывает новые перспективы для разработки новых лекарственных препаратов в целях таргетной иммунотерапии.

Список литературы

1. Croia C., Bursi R., Suter D., Petrelli F., Alunno A., Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 2019. Vol. 37(3). P.347-357.

2. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J. Innate Immun.* 2018. Vol. 10. P. 414–421. DOI: 10.1159/000489829.
3. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010. Vol. 191. P. 677–91. DOI: 10.1083/jcb.201006052.
4. Koga T., Morotomi-Yano K., Sakugawa T., Saitoh H., Yano K.I. Nanosecond pulsed electric fields induce extracellular release of chromosomal DNA and histone citrullination in neutrophil-differentiated HL-60 cells. *SciRep.* 2019. Vol. 9(1). P. 8451. DOI: 10.1038/s41598-019-44817-9.
5. Rohrbach A.S., Slade D.J., Thompson P.R., Mowen K.A. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 2012. Vol. 3. P. 360. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00360/full> (дата обращения 10.02.2020). DOI: 10.3389/fimmu.2012.00360.
6. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., Friday S., Li S., Patel R.M., Subramanian V., Thompson P., Chen P., Fox D.A., Pennathur S., Kaplan M.J. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013. Vol. 5(178). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727661/> (дата обращения 10.02.2020). P. 178ra40. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005580.
7. Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Бедина С.А., Доценко С.С., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э. Внеклеточные нейтрофильные ловушки и их возможная роль в образовании антицитруллиновых антител при ревматоидном артрите // Актуальные проблемы современной ревматологии: сб. науч. работ / Под ред. д.м.н., профессора И.А. Зборовской. Волгоград, 2018. Вып. XXXV. С. 202-211. DOI: 10.18411/978-5-907109-24-7-2018-xxxv-202-211.
8. Насонов Е.Л. Российские клинические рекомендации. Ревматология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с.
9. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9. № 1. С. 9–38. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-1-9-38.