

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ
ВОЛЧАНКОЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», учреждение «Гомельская областная клиническая больница»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Новикова И.А., Зубкова Ж.В., к.м.н., доцент Петренко Т.С.

Гомель, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения фазы воспаления у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системной красной волчанкой (СКВ) по оценке способности нейтрофилов крови к образованию внеклеточных ловушек (NETs, neutrophil extracellular traps), опосредованному тромбоцитами (тромбоцит-ассоциированный нетоз). Метод позволяет объективизировать оценку состояния пациентов с РА и СКВ в дополнение к рутинным лабораторным тестам (скорость оседания эритроцитов и С-реактивный белок).

Метод, изложенный в данной инструкции, предназначен для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-ревматологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ревматоидным артритом и системной красной волчанкой в амбулаторных и стационарных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Ревматоидный артрит (M05, M06), системная красная волчанка (M32) в следующих ситуациях:

достижение убедительного клинического улучшения (снижение припухлости суставов, боли, утренней скованности для РА; уменьшение суставных, кожных, сосудистых, неврологических и других органических проявлений для СКВ) вследствие проводимой терапии, но отсутствие нормализации лабораторных признаков воспаления (СОЭ и СРБ);

отсутствие четких клинических симптомов улучшения при нормальных значениях СОЭ и СРБ;

достижение неполного клинического и лабораторного улучшения (не все клинические и лабораторные параметры достигли нормальных показателей) в ходе лечения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1. Медицинское оборудование:

1.1. центрифуга лабораторная медицинская типа «Элекон ЦЛМН-р10-01» или аналог;

1.2. холодильник бытовой;

1.3. световой микроскоп с иммерсионным объективом и общим увеличением 900х-1000х;

1.4. автоматические дозаторы (0,05 – 0,5 мл и 0,1 – 1 мл) с одноразовыми наконечниками;

1.5. термостат.

2. Изделия медицинского назначения:

2.1. пробирки из полипропилена одноразового применения для взятия биологического материала;

2.2. круглодонные планшеты одноразового применения для проведения иммунологических реакций;

2.3. предметные стекла;

2.4. шлифованные стекла;

2.5. камера Горяева;

2.6. дистиллированная вода;

2.7. раствор аденозиндифосфата (АДФ) 2,5 мкг/мл;

2.8. раствор красителя по Романовскому-Гимзе;

2.9. иммерсионное масло для микроскопии.

3. Лекарственные средства:

- 3.1. раствор гепарина натрия от 12 до 30 МЕ/мл;
- 3.2. раствор хлорида натрия 0,9%, аптечный;
- 3.3. спирт этиловый 96%.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Метод, изложенный в данной инструкции, предусматривает последовательное выполнение следующих этапов определения тромбоцит-опосредованного образования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

1 этап – подготовка лейкоцитов

Материалом для исследования является периферическая венозная кровь.

Кровь получают путем венепункции в пластиковые пробирки, используя в качестве антикоагулянта раствор гепарина натрия (из расчета 10 МЕ гепарина на 1 мл крови).

Лейкоциты получают путем отстаивания гепаринизированной крови в течение 45 минут при температуре 37 °С. Отбирают нижний слой плазмы с лейкоцитарной пленкой. Количество гранулоцитов в суспензии доводят до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством 0,9% раствора хлорида натрия (контроль в камере Горяева).

2 этап – подготовка тромбоцитов

Для исследования используют обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП).

ОТП получают путем центрифугирования плазмы крови (из этого же образца крови) в течение 5 минут при 1000 об/мин (200 g). Часть ОТП (не менее 250 мкл) отбирают, а остальную дополнительно центрифугируют в течение 15 минут при 2700-3000 об/мин (1200 g) для получения

бестромбоцитарной плазмы (БТП). Количество тромбоцитов в ОТП доводят до $200\text{--}300 \times 10^9/\text{л}$ путем добавления БТП (контроль в камере Горяева).

3 этап – подготовка раствора индуктора

Раствор индуктора готовят согласно инструкции производителя. Для приготовления концентрированного раствора, лиофильно высушенный АДФ, растворяют до концентрации 1×10^{-3} моль/л. Рабочий раствор АДФ готовят разведением концентрированного раствора раствором натрия хлорида в 40 раз. Концентрация АДФ в рабочем растворе – 5×10^{-5} моль/л.

4 этап – ход определения

4.1. Для оценки базального уровня тромбоцит-ассоциированного нетоза (NET-Р_{баз}) в лунки полистирольного планшета или в пластиковые пробирки вносят в равных объемах (по 0,05 мл) подготовленные лейкоциты и ОТП. Для теста со стимулированными тромбоцитами (NET-Р_{ст}) в клеточную культуру вносят 0,01 мл раствора АДФ. Конечная концентрация АДФ в клеточной культуре – 5×10^{-6} моль/л.

4.2. Клеточные культуры инкубируют 30 (ранний нетоз) и 150 минут (поздний нетоз) при температуре 37 °С, центрифугируют в течение 5 минут при 1000 об/мин (200g), надосадочную жидкость удаляют путем аспирации, осадок суспендируют пипеткой, наносят на предметное стекло и делают тонкие мазки шлифованным стеклом.

4.3. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют этанолом, окрашивают по Романовскому-Гимзе и микроскопируют с использованием иммерсионного увеличения (объектив x100 окуляр x10).

5 этап – учет результатов

Подсчитывают количество нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые представлены тонкими свободнолежащими внеклеточно расположенными нитями, занимающими пространство, в 2-3 раза

превосходящее размер неизмененного нейтрофила. Учитывают количество NETs на 200 сосчитанных нейтрофилов, результат выражают в процентах.

6 этап – интерпретация результатов

Значения параметров NET-Р_{ст} (ранний)<3% и NET-Р_{ст} (поздний)<7,5% у пациентов с РА и параметров NET-Р_{баз} (поздний)<5,5% и NET-Р_{ст} (ранний)<4,5% у пациентов с СКВ свидетельствуют об отсутствии острой фазы воспаления.

Значения параметров NET-Р_{ст} (ранний)>3% и NET-Р_{ст} (поздний)>7,5% у пациентов с РА и параметров NET-Р_{баз} (поздний)>5,5% и NET-Р_{ст} (ранний)>4,5% у пациентов с СКВ свидетельствуют о наличии острой фазы воспалительного процесса.

Ситуация, когда значения одного из показателей ниже порогового, при этом второй показатель превышает пороговое значение, трактуется как неполное прекращении воспалительного процесса. Целесообразны повторные исследования при завершении очередного этапа терапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений нет.

Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа:

- 1) нарушение допустимых сроков хранения крови (более 2х часов) приводит к погрешностям в результатах исследования;
- 2) неправильный подбор пробирок (использование стеклянных пробирок) приводит к активации клеток;
- 3) подсчет NETs в толстой части мазка снижает возможность их четкой идентификации.

Пути устранения:

1. Проведение исследования не позднее 2-х часов с момента взятия материала.

2. Использование пластиковых пробирок.

3. Подсчет NETs в тонкой части мазка.

Контроль качества исследования осуществляется методом исследования параллельных проб и повторных проб согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь №873 от 10.09.2009 «Об утверждении инструкции по контролю качества клинических лабораторных исследований».

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим НПА.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

В настоящее время в клинической практике для оценки активности воспаления при ревматоидном артрите (РА) и системной красной волчанке (СКВ) используют составные индексы (в частности, DAS28 для РА, SLEDAI для СКВ), которые основаны на данных клинического осмотра и опроса пациентов, а из лабораторных параметров — значениях СОЭ и С-реактивного белка [1]. Однако использование клинических симптомов для мониторинга воспаления достаточно субъективно, а вышеуказанные лабораторные показатели зачастую имеют слабую выраженность изменений [2]. Особую сложность представляют ситуации с расхождением результатов клинической и лабораторной оценки: клиническое улучшение при отсутствии нормализации лабораторных параметров либо слабая динамика клинических проявлений при положительных сдвигах СОЭ и СРБ. Такие ситуации сопряжены с трудностями в принятии решения о дальнейшем ведении пациента.

Нейтрофилы, как важнейшая составляющая врожденного иммунитета играют центральную роль в развитии и поддержании воспалительного процесса. Одним из множества проявлений реактивности нейтрофилов является образование ими внеклеточных сетей (NETs, neutrophil extracellular traps) [3]. Установлено, что при аутоиммунных заболеваниях NETs являются основным источником аутоантигенов, мощным активатором комплемента и синтеза аутоантител. Последние в свою очередь приводят к повреждению тканей и высвобождению новых аутоантигенов, создавая новые мишени для аутоиммунного ответа и способствуя запуску порочного аутоиммунного цикла [4]. Активность

нетоза ассоциирована с тяжестью течения и наличием осложнений при системных заболеваниях соединительной ткани [5, 6], а также с развитием васкулопатий и микротромбозов [7, 8, 9]. Это указывает на перспективность использования параметров нетоза для контроля за течением воспалительного процесса при этой патологии. Однако влияние на процессы образования и деградации NETs множества компонентов, присутствующих в крови пациентов с РА и СКВ, затрудняют их применение для оценки активности воспалительного процесса и могут являться причиной неоднозначных результатов [10].

Тромбоциты являются активными участниками иммунного воспаления, оказывая регулирующее влияние на все звенья иммунной системы [11]. Известно, что при РА и СКВ активность тромбоцитов увеличена и связана с выраженностью воспалительного процесса [12, 13]. Поэтому пренебрежение присутствующими в анализируемой лейкосуспензии тромбоцитами может быть одной из причин нестабильности результатов по оценке нетоза. Предлагаемый нами метод позволяет, с одной стороны, стандартизировать постановку теста определения активности нетоза, с другой стороны – оценить результирующую тромбоцит-нейтрофильных взаимодействий. Постановка теста в предлагаемом варианте показала достоверные различия параметров нетоза в зависимости от фазы воспалительного процесса. Превышение пороговых значений тромбоцит-ассоциированного нетоза, установленных методом регрессионного анализа, объективно подтверждает острую фазу воспаления. Это особенно важно в ситуациях, когда имеются расхождения между выраженностью клинических симптомов и результатами оценки СОЭ и СРБ у пациентов с РА и СКВ.

Предлагаемый способ прост в исполнении, не требует использования дорогостоящих реактивов и дополнительного времени. Тест может

выполняться в клиничко-диагностических лабораториях районного, областного и республиканского уровней.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Проблемы низкой активности и ремиссии при системной красной волчанке. / Соловьев С.К. [и др.] // Научно-практическая ревматология.- 2019. - ; Т.57, №2. – С.218-221.

2. Prolonged clinical remission in patients with systemic lupus erythematosus. / Steiman A.J. [et al.] // J Rheumatol. – 2014. - №41. P.1808-1816.

3. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты. / Воробьева Н.В. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. -2020. - Т. 75, № 4. – С. 210-225.

4. Gupta S. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. / Gupta S., Kaplan MJ. // Nat Rev Nephrol. – 2016. - №12. – P.402–413.

5. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. / Leffler J. [et al.] // J Immunol. – 2012. - №188. – P.3522–3531.

6. Human neutrophil peptide 1-3, a component of the neutrophil extracellular trap, as a potential biomarker of lupus nephritis. / Cheng F.J. [et al.] // Int J Rheum Dis. – 2015. - №18. – P.533–540.

7. O’Neil L.J. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in vascular damage in systemic lupus erythematosus. / O’Neil LJ, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. // J Clin Med. – 2019. - №8. – P.1325.

8. Liew P.X. The neutrophil's role during health and disease. / Liew PX, Kubes P. // Physiol Rev. – 2019. – Vol. 99, №2. – P.1223–1248.

9. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. / Silvestre-Roig C. [et al.] // Nature. – 2019. - Vol. 569, №7755. – P.236–240.

10. Gustaf W. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. / Gustaf W., Mariana J.K. // Nature Reviews. Immunology. – 2023. – Vol. 23. – P. 274-288.

11. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций / Серебряная Н.Б. [и др.] // Медицинская иммунология. - 2019. - Т. 21, № 1. - С. 9-20.

12. Новикова И.А .Эффект тромбоцитов на формирование нейтрофилами экстрацеллюлярных сетей у пациентов с системной красной волчанкой. / Новикова И.А., Зубкова Ж.В. // Медицинская иммунология. - 2020. - Т. 22, № 6. - С. 1173-1178.

13. Зубкова Ж.В. Морфо-функциональные особенности тромбоцитов у пациентов с ревматоидным артритом. / Зубкова Ж.В., Новикова И.А. // Проблемы здоровья и экологии. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 55–61.