

## УЧАСТИЕ ПЛАЗМЫ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ СЕТЕЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ

© 2019 г. А. Ю. Савочкина\*, О. С. Абрамовских, Э. Н. Мякишева,  
К. А. Абрамовских

\*E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации. Научно-исследовательский  
институт иммунологии ЮУГМУ, Челябинск, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Беременность является уникальным феноменом «мирного сосуществования» материнского организма и полуаллогенного плода. Для обеспечения жизнедеятельности, роста, развития эмбриона и плода в организме будущей матери происходят существенные изменения, которые касаются практически всех систем организма, в том числе иммунной системы и системы гемостаза. В работе представлены результаты оценки способности нейтрофилов к формированию NETs в I триместре беременности.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, беременность, гемостаз, нейтрофильные внеклеточные ловушки

DOI: 10.31857/S102872210007263-4

**Адрес:** Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Савочкина Альбина Юрьевна. Тел.: +79127725806.

**E-mail:** [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

**Авторы:**

**Савочкина А. Ю.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Абрамовских О. С.**, д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Мякишева Э. Н.**, соискатель ученой степени кандидата биологических наук кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

**Абрамовских К. А.**, студентка 5 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

С позиции иммунологии репродукции, беременность представляет собой физиологически обусловленное состояние толерантности иммунной системы матери к генетически чужеродному плоду. Иммунная толерантность основана на согласованных действиях гормонов и цитокинов, а также взаимодействие между врожденными и адаптивными иммунными клетками [1]. Традиционно большинство исследований, изучающих присутствие и действие иммунных клеток в плаценте, касались врожденных иммунных эффекторных клеток, таких как децидуальные НК-клетки (dNK), макрофаги, дендритные клетки или более поздние регуляторные Т-клетки (Treg) [2, 3]. Новые данные показывают, что нейтрофилы также играют важную роль в поддержании нормальной беременности. Однако данные разных авторов весьма противоречивы. Согласно одним авторам, функциональная активность нейтрофилов при беременности снижена [4], в частности, снижена способность нейтрофилов к хемотаксису. Это снижение рассматривается

авторами как часть материнской иммуносупрессии, которая имеет важное значение для защиты полуаллогенного плода. Однако другие авторы утверждают, что функциональная активность нейтрофилов при беременности, наоборот, возрастает [5, 6, 7, 8]. В. И. Циркин с соавт. также установили, что физиологически протекающая беременность связана с фенотипическими и метаболическими изменениями гранулоцитов и моноцитов, которые подобны тем, что возникают при инфекции, но менее выражены. Все эти исследования подтверждают представление ряда авторов о том, что при физиологической беременности активность врожденного (неспецифического) иммунитета возрастает и тем самым повышает устойчивость матери и плода к возбудителям инфекции и беременность рассматривается как своеобразное системное воспаление, в котором нейтрофилы играют одно из ведущих мест [5, 6, 7, 8].

С наступлением беременности естественным изменениям подвергается и система гемостаза, при котором происходит увеличение уровня большинства факторов свертывания, снижения количества естественных антикоагулянтов и ингибирование фибринолиза [9]. При этом повышается уровень факторов XII, X, IX, VIII, V, VII, фактор Виллебарнда, фибриноген [10]. Фибринолитическая способность снижается во время беременности, главным образом, из-за заметно повышенного уровня ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) из эндотелиальных клеток и ингибитора-активатора плазминогена-2 (PAI-2) из плаценты [11]. Также происходит повышение функциональной активности тромбоцитов при некотором снижении их количества [9]. Эти изменения увеличиваются с прогрессированием беременности и носят компенсаторно-приспособительный характер. Баланс между прокоагулянтным и антикоагулянтным звеньями гемостаза играет важную роль для имплантации и развития формирующейся плаценты. Однако, низкое давление и замедленная скорость кровотока, характерные для плацентарной циркуляции, в сочетании с гиперкоагуляцией при беременности создает условия, предрасполагающие к тромбозу [12]. В связи с этим перед исследователями и практическими врачами встает необходимость изучения механизмов, при которых происходит нарушение баланса системы гемостаза и какие воздействия являются ключевыми для инициации каскада свертывания крови.

Исследования последних лет говорят о значительном участии нейтрофилов в нарушении в системе гемостаза, в том числе и при осложнениях, возникающих при беременности [13, 14]. В частности, структуры на основе хроматина, называемые внеклеточными ловушками нейтрофилов (NETs), играют ключевую роль в активации каскада коагуляции, активации тромбоцитов и служат в качестве основы для формирования тромба [15]. Нити ДНК сетей нейтрофильных гранулоцитов могут являться стимулом для контактной активации свертывающей системы [16, 17, 18]. Отрицательно-заряженная поверхность NETs, способна активировать фактор XII. Коагуляционный фактор XII, плазменная сериновая протеаза, активирующая фактор XI и прекаликреин, является традиционным инициатором «внутреннего пути» свертывания [19]. Кроме того, работы Fuchs et al. указывают на то, что отрицательно-заряженная поверхность NETs может также связываться с такими белками плазмы как фибриноген, фибронектин и фактор фон Виллебарнда (VWF), тем самым стабилизируя сгусток [20].

В связи с тем, что беременность сопровождается увеличением массы циркулирующей крови (гиперволемиа), повышением коагуляционного потенциала плазмы, замедлением скорости маточно-плацентарного кровотока, а также изменениями гормонального фона, актуальным на сегодняшний день остается изучение активности нейтрофилов и факторов способствующих образованию NETs во время беременности.

Была сформулирована **цель**: оценить влияние плазмы беременных и небеременных женщин на процессе формирования внеклеточных сетей нейтрофилами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования была периферическая кровь 12 условно здоровых женщин и 12 беременных женщин в I триместре (средний срок гестации 7 недель) без нарушений показателей гемостаза, в возрасте от 18–40 лет. Критериями включения в исследование для здоровых небеременных женщин являлись: первая фаза менструального цикла; отсутствие приема лекарственных препаратов; хронических заболеваний в стадии обострения. Критериями включения беременных женщин являлись: I триместр беременности, отсутствие акушерско-гинекологической патологии, отсутствие тромботических осложнений, которые оценивались врачом

акушером-гинекологом на основании общеклинических и лабораторных данных. Добровольное согласие на обследование получено от всех участников.

Проведена оценка системы гемостаза на автоматическом коагулометре STA Compact Max ("Diagnostica Stago", Франция). Определяли такие параметры гемостазиограммы как ПВ (протромбиновое время), АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время), тромбиновое время, уровни фибриногена и антитромбина III. Для количественного определения в плазме крови растворимых фибринмономерных комплексов (РФМК) мануальным методом использовали реагенты РФМК-тест (ООО Технология стандарт, Россия). Для исследования фибринолитической системы использовали тесты: эуглобулиновый лизис и XIIa-зависимый лизис (тест-системы ООО Технология стандарт, Россия). Функциональное состояние тромбоцитов оценивали при помощи 4-канального лазерного анализатора «Viola-230LA» (ООО НПФ «Биола», Россия) методом световой агрегометрии. Исследовалась спонтанная и индуцированная агрегация с использованием индукторов агрегации АДФ (ООО «Технология-стандарт», Россия) в концентрации 5,0 мкмоль, адреналин (ООО «Технология-стандарт», Россия), коллаген (ООО «Технология-стандарт», Россия).

Оценку способности нейтрофилов к формированию внеклеточных сетей проводилось по методу И. И. Долгушина и соавт. [21]. Для этого нами были сформированы 4 экспериментальные группы: 1 группа (К-) – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добав-

ляли физиологический раствор; 2 группа (К+) – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат (ФМА); 3 группа – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат и плазму здоровых небеременных женщин; 4 группа – к нейтрофилам, выделенным из периферической крови, добавляли активатор форбол-12-мири- стат-13-ацетат и плазму беременных женщин I триместра. Далее все пробы инкубировали *in vitro* в течение 30 минут при температуре 37 °С. Материал наносили на предметное стекло, высушивали, фиксировали 96% этиловым спиртом и мазок окрашивали по Романовскому-Гимзе. Оценивалось соотношение морфологических форм нейтрофилов и число NETs. Данные анализировались с применением непараметрического метода U-критерий Манна-Уитни для расчета уровня значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты соотношения морфологических форм нейтрофильных гранулоцитов и количества NETs при взаимодействии плазмы здоровых небеременных и беременных женщин представлены в **Таблице 1**. Морфологические формы интактных нейтрофилов достоверно отличаются от нейтрофилов, активированных ФМА. При добавлении к активированным нейтрофилам плазмы небеременных женщин и плазмы беременных женщин регистрируется снижение образования НВЛ, что дает основание утверждать о наличии в плазме факторов, подавляю-

**Таблица 1.** Морфологические формы интактных и активированных нейтрофилов при их совместной инкубации с ФМА и плазмы здоровых женщин, плазмы беременных женщин (n = 12, M ± m)

Группы	Морфологические формы нейтрофилов, %		
	Нейтрофилы с сегментированным ядром	Нейтрофилы с недифференцированным ядром	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
Нейтрофилы + физ.р-р (К-) (1 группа)	90,41±1,18	6,16±0,93	3,41±0,35
Нейтрофилы + ФМА (К+) (2 группа)	57,66±1,75*	20,5±1,68*	21,75±0,50*
Нейтрофилы + ФМА + плазма небеременных женщин (3 группа)	90,66±1,38**	6,66±0,91**	3,33±0,46**
Нейтрофилы + ФМА+ плазма беременных женщин I триместра (4 группа)	63,08±3,72**/**	23,75±3,26***	12,91±1,28**/**

**Примечание:** p<0.05; \* – достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении групп 1 и 2; \*\*-достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении группы 2 с группами 3 и 4; \*\*\*- достоверное отличие морфологических форм нейтрофилов при сравнении групп 3 и 4



ших формирование внеклеточных сетей. Однако привлекает внимание тот факт, что влияние плазмы крови небеременных женщин на нейтрофилы, выделенные из периферической крови, полностью инактивирует выброс внеклеточной ДНК нейтрофилами, несмотря на действие активатора. Плазма, полученная от беременных женщин, при взаимодействии с нейтрофилами также приводит к снижению формирования внеклеточных сетей данными клетками, но показатель достоверно выше, в сравнении с действием плазмы полученной от небеременных женщин. Возможно, это связано с тем, что в период беременности изменяется гормональный фон женщины – продукция многих гормонов возрастает и появляются гормоны, ранее не синтезируемые в организме женщины, вследствие чего образуются новые взаимосвязи иммунно-гормональной регуляции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Arck P.C., Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nature Medicine* vol.19, 2013, 548–556
2. Schumacher M., Mattern C., Ghomari A., Oudinet J., Liere P., Labombarda F. Revisiting the roles of progesterone and allpregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors // *Prog Neurobiol.* 2014; V. 113, 6–39.
3. Rätsep M., Felker A., Kay V., Toluoso L., Hofmann A., & Croy B. (2015). Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis, *REPRODUCTION*, 149(2),91–102.
4. Lampé R, et al. Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *Reprod Immunol.* 2015.
5. Циркин В.И., Анисимов К.Ю., Полежаева Т.В., Зайцева О.О., Худяков А.Н., Соломина О.Н., Хлыбова С.В., Дмитриева С.Л., Попова В.С. Роль нейтрофилов при физиологическом течении беременности, родов и ряде акушерских осложнений // *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2015. № 4, 75–86. [Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Khlybova S.V, Dmitrieva S.L., Popova V.S. The role of neutrophils in the physiological course of pregnancy, childbirth and a number of obstetric complications // *Bulletin of the Ural Medical Academic Science.* 2015. № 4, 75–86.]
6. Luppi P., Haluszczak C., Betters D., Richard C., Trusco M., DeLoia J. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. // *J Leukoc Biol.* 2002; V. 72, № 5, 874–884.
7. Худяков А.Н., Зайцева О.О., Соломина О.Н. Изучение эстрогенореактивности нейтрофилов крови женщин на разных сроках беременности и при угрозе преждевременных родов // *Вопросы фундаментальной и прикладной физиологии в исследованиях студентов вузов: Материалы VII всероссийской молодежной научной конференции.* Киров: ВятГГУ, 2015, 166–169. [Khudyakov A. N., Zaitseva O. O., Solomina O. N. Study of the estrogen reactivity of the blood neutrophils of women at different stages of pregnancy and with the threat of preterm labor // *Questions of fundamental and applied physiology in research of university students: Proceedings of the VII All-Russian Youth Scientific Conference.* Kirov: VyatGGU, 2015,166–169.]
8. Naccasha N., Gervasi M., Chaiworapongsa T., Berman S., Yoon B., Maymon E., Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. // *Am J Obstet Gynecol.* 2001; V. 185, № 5, 1118–1123.
9. P. Thornton, J. Douglas. Coagulation in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2010, Volume 24, Issue 3, 339–352
10. Simioni P. Thrombophilia and gestational VTE // *Thromb. Res.* – 2009. – Vol.123, Suppl.2,41–44.
11. Hellgren M. «Hemostasis during Normal Pregnancy and Puerperium» *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29, 125–130.
12. Kujovich J. L. «Thrombophilia and pregnancy complications» // *Am J. Obstet. Gynecol.* 2004. Vol.191, 412–424.
13. Mizugishi K., Yamashita K. Neutrophil extracellular traps are critical for pregnancy loss in sphingosine kinase-deficient mice on 129Sv/C57BL/6 background. *FASEB J.* Vol.31 (12) 2017
14. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.* 2005, 66,1146–1154.
15. Rao A. N., Kazzaz N. M., Knight J. S. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World Journal of Cardiology.* 2015; 7(12), 829–842.
16. Von Brühl M.-L., Stark K., Steinhart A., et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of Experimental Medicine.* 2012;209(4),819–835.
17. Pfeiler S., Massberg S., Engelmann B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res* 2014;133(1),35–37;
18. Лунец Е.Н., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. Интегральные лабораторные тесты гемостаза в диагностике гиперкоагуляции и оценке риска тромбоза // *Онкогематология* № 3 т. 10 2015, 73–77. [Lipets E. N., Ataullakhanov F. I., Panteleev M. A. Integral laboratory tests of hemostasis in the diagnosis of hypercoagulation and assessment of the risk of thrombosis // *Oncohematology* № 3, vol.10 2015,73–77]
19. Rao A. N., Kazzaz N. M., Knight J. S. Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World Journal of Cardiology.* 2015; 7(12), 829–842.
20. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the USA. 2010; 107(36), 15880–15885.
21. Долгушин И. И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И. И. Долгушин, Ю. С. Шишкова, А. Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 3. – С. 458–462. [Dolgushin I. I. Methods for detecting neutrophilic traps / I. I. Dolgushin, Yu. S. Shishkova, A. Yu. Savochkina // Allergology and Immunology. – 2009. – V. 10, № 3, 458–462].

## PARTICIPATION OF PLASMA OF PREGNANT WOMEN DURING FORMATION OF EXTRACELLULAR TRAPS NEUTROPHIL

© 2019 A. Yu. Savochkina\*, O. S. Abramovskikh, E. N. Myakisheva, K. A. Abramovskikh

\*E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation.  
Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

Pregnancy is a unique phenomenon of the “peaceful coexistence” of the maternal organism and the semi-allogenic fetus. For maintenance of ability to live, growth, progress of an embryo and a fruit in an organism of future mother there are essential variations which concern practically all systems of an organism, including immune system and system of a hemostasis. In work results of an assessment of capacity neutrophils to formation NETs in I a trimester of pregnancy are presented.

*Key words:* Neutrophils, pregnancy, hemostasis, Neutrophil extracellular traps

### Authors:

**Savochkina A. Yu.**, ✉ MD, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

Chelyabinsk, South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation. Phone: +79127725806,  
E-mail: [alina7423@mail.ru](mailto:alina7423@mail.ru)

**Abramovskikh O. S.**, MD, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Myakisheva E. N.**, post-graduate student Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

**Abramovskikh K. A.**, 5<sup>th</sup> year student of the medical faculty of the South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.