

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.155.34:616.5-002.3 (043.3)

**ГУСАКОВА**  
**Наталья Викторовна**

**НЕТОЗ И ДРУГИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ  
РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ИНФЕКЦИЯХ**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Минск 2017

Научная работа выполнена в учреждении образования «Гомельский государственный медицинский университет».

**Научный руководитель:** **Новикова Ирина Александровна,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Потапнев Михаил Петрович,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом клеточных биотехнологий государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

**Ляликов Сергей Александрович,**  
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики и иммунологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

**Оппонирующая организация:** государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита состоится 16 ноября 2017 г. в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, телефон: +375 17 2725598, e-mail: uchsovet@bsmu.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «4» октября 2017 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций  
кандидат медицинских наук, доцент



А. М. Дронина

## ВВЕДЕНИЕ

Хроническое рецидивирующее течение инфекционно-воспалительных заболеваний различной этиологии является одной из актуальных проблем практического здравоохранения в связи с их широким распространением, увеличением числа тяжелых форм, а также отсутствием предикторов эффективности проведения терапевтических мероприятий применительно к конкретному пациенту [Желтова О. И., 2011, Mwambete K. D., 2013]. Наиболее типичными примерами хронических рецидивирующих инфекций (ХРИ) являются хронический рецидивирующий фурункулез (ХРФ) и рецидивирующая герпетическая инфекция (РГИ). Известно, что характер течения инфекционно-воспалительных заболеваний находится в тесной причинно-следственной взаимосвязи с состоянием иммунологической реактивности, поэтому оценка состояния иммунной системы у пациентов с ХРИ не теряет своей значимости [Лукьянов А. М., 2011, Доценко Э. А., 2014, Singh S., 2015]. В то же время нарушения иммунологических механизмов, лежащих в основе клинической манифестации ХРИ, не всегда удается четко верифицировать стандартными методами иммунодиагностики.

В последние годы значительно возрос интерес исследователей к роли гранулоцитов, как одного из факторов, участвующих в хронизации и рецидивировании инфекционно-воспалительных заболеваний [Mantovani A., 2011, Катунина О. Р., 2011, Камбачокова З. А., 2012]. Несмотря на большое количество работ, посвященных оценке функционального статуса нейтрофильных гранулоцитов (НГ) у пациентов с ХРИ, сведения об имеющихся изменениях противоречивы и не всегда обладают клинической информативностью. В связи с этим поиск и клиническая апробация новых показателей функциональной активности НГ для мониторинга течения ХРИ, как проявления вторичного иммунодефицита, является актуальной научно-практической задачей, решение которой позволит повысить эффективность проводимой терапии, улучшая качество жизни пациентов. Перспективным показателем для включения в комплекс иммунологического тестирования при ХРИ является оценка процесса гибели нейтрофилов – нетоз, сопровождающийся образованием нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (neutrophil extracellular traps, NET), которые играют важную роль во внеклеточном захвате и киллинге грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и паразитов, а также выполняют иммунорегуляторную функцию [Долгушин И. И., 2010, Saffarzadeh M., 2014, Nel J. G., 2016]. Однако до настоящего времени не ясна клиническая ценность определения нетоза, а также его связь с другими проявлениями функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ХРИ.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Связь работы с научными программами (проектами), темами**

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской темы кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» «Разработка лабораторных критериев диагностики и мониторинга инфекционно-воспалительных заболеваний различной этиологии» (сроки выполнения 2012–2017 гг., № гос. регистрации 20123040).

### **Цель и задачи исследования**

*Цель:* обосновать применение оценки нетоза в комплексе с другими функциональными параметрами нейтрофилов крови для иммунологической диагностики и мониторинга течения хронических рецидивирующих инфекций бактериальной и вирусной этиологии.

#### *Задачи:*

1. Оптимизировать метод оценки NET-образующей способности нейтрофилов крови человека и установить референтные значения показателей спонтанного и стимулированного нетоза.

2. Провести комплексную оценку функционального статуса нейтрофилов, включая показатели нетоза, апоптоза, фагоцитоза, продукцию АФК (активных форм кислорода) и NO, у пациентов с ХРФ и РГИ.

3. Оценить зависимость изменений функциональных свойств нейтрофилов крови от клинических особенностей течения и стадии заболевания у пациентов с ХРФ и РГИ.

4. На основании сравнительного анализа изменений показателей функциональной активности нейтрофилов, разработать метод оценки полноты ремиссии заболевания у пациентов с ХРФ и РГИ.

*Объект исследования:* периферическая кровь (нейтрофилы) здоровых лиц и пациентов с ХРФ и РГИ.

*Предмет исследования:* показатели функциональной активности нейтрофилов.

### **Научная новизна**

Разработан метод оценки нетоза в нефракционированной суспензии лейкоцитов, обладающий хорошей воспроизводимостью, значительно снижающий трудоемкость исследования, позволяющий расширить перечень тестов функциональной активности нейтрофилов у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями.

Впервые обнаружена повышенная способность нейтрофилов крови к образованию экстрацеллюлярных сетей у пациентов с тяжелым течением ХРФ и РГИ.

Показана зависимость степени повышения нетоза от стадии заболевания (ремиссия, обострение), а у пациентов с РГИ – дополнительно от локализации высыпаний.

Обнаружен дефект продукции NO нейтрофилами крови у пациентов с РГИ тяжелого течения, проявляющийся инверсной реакцией на стимуляцию. Показана зависимость генерации NO от длительности заболевания и локализации герпесвирусной инфекции.

Показано, что на фоне клинической ремиссии у пациентов с тяжелым течением ХРФ и РГИ сохраняются комплексные нарушения функциональных свойств нейтрофилов в виде повышения АФК-продуцирующей активности на фоне инверсии образования NO и увеличения уровня нетоза с одновременным торможением процессов апоптоза.

Выявлено сходство изменений функциональных свойств нейтрофилов крови в межрецидивный период у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями бактериальной и вирусной этиологии.

Впервые доказано, что показатели нетоза и апоптоза нейтрофилов крови являются адекватными лабораторными маркерами полноты ремиссии у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Для оценки способности нейтрофилов периферической крови человека к нетозу информативна клеточная модельная система, основанная на использовании нефракционированной лейкоцитарной суспензии, секреторных продуктов *S. aureus* в качестве индуктора, последующей 150-минутной инкубации и визуализации NET путем окрашивания по Романовскому. Параллельное определение спонтанного и индуцированного уровня нетоза позволяет оценивать резервный потенциал нейтрофилов в ответ на дополнительную стимуляцию.

2. В стадии клинической ремиссии у пациентов с ХРФ отмечаются комплексные изменения функциональных свойств нейтрофилов: повышается уровень нетоза в ответ на стимуляцию *in vitro*, но снижается интенсивность апоптоза и генерация NO на фоне высокого образования радикалов кислорода и азота в спонтанных тестах. Способность нейтрофилов к апоптозу, генерации АФК и NO зависит от давности заболевания. Максимальные изменения показателей нетоза и апоптоза нейтрофилов наблюдаются в период обострения ХРФ.

3. У пациентов с РГИ в период клинической ремиссии повышается способность нейтрофилов к нетозу в ответ на стимуляцию *in vitro*, снижается интенсивность апоптоза и генерации NO на фоне высокого образования радикалов кислорода в спонтанном тесте. Способность нейтрофилов к нетозу и генерации NO проявляет зависимость от локализации герпетических высыпаний. Наиболее высокая NET-образующая способность нейтрофилов наблюдается при обострении РГИ.

4. Показатели нетоза и апоптоза нейтрофилов можно использовать в качестве дополнительных лабораторных критериев оценки полноты ремиссии у пациен-

тов с рецидивирующими инфекционно-воспалительными заболеваниями: значения NETст ниже 16,5%, а Аст выше 24,5% у пациентов с ХРФ, и NETст и Асп менее 19,5% и 7,5% соответственно, у пациентов с РГИ, ассоциируются с полной ремиссией заболевания.

5. У пациентов с ХРФ и РГИ в период клинической ремиссии показатели некроза и апоптоза, а также АФК- и NO-продуцирующей активности нейтрофилов изменены однотипно. В отличие от пациентов с РГИ, у пациентов с ХРФ при обострении инфекционно-воспалительного процесса наблюдается подавление апоптоза.

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Соискателем совместно с научным руководителем осуществлено планирование диссертационного исследования, определены тема, цель и задачи. Основные научные результаты, изложенные в диссертации, автором получены лично. Соискателем самостоятельно проведен анализ данных литературы и патентно-информационный поиск по теме диссертации, выполнена экспериментальная часть работы, анализ и систематизация полученных данных, их статистическая обработка (100%). Вклад автора в написание статей [1–18] – 90%, тезисов [19–24] – 80%, разработку инструкции по применению [25] – 85%, разработку заявки на изобретение [26] – 85%. Участие соавторов отражено в совместных публикациях.

#### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Основные результаты работы, включенные в диссертацию, доложены и обсуждены на следующих республиканских и международных конференциях: «Актуальные проблемы медицины» (Гомель, 2011–2016 гг.), «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 2011–2016 гг.), «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє» (Запорожье, 2012 г.), «Актуальные вопросы современной медицины» (Харьков, 2013 г.). Результаты научно-исследовательской работы внедрены в практическое здравоохранение (ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (РНПЦ РМиЭЧ), УЗ «Гомельская городская клиническая больница» № 1, УЗ «Гомельская областная инфекционная клиническая больница»), в учебный процесс (УО «Гомельский государственный медицинский университет» (ГомГМУ)).

#### **Опубликование результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано: 6 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» объемом 3,6 авторских листа, 12 статей в сборниках материалов конференций, 6 тезисов докла-

дов научных конференций, 1 инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Получено 1 решение о выдаче патента на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 75 русскоязычных и 149 англоязычных источников, списка публикаций соискателя, приложений. Объем диссертации – 127 страниц, в том числе 17 таблиц занимает 9 страниц, 14 рисунков – 5 страниц, 14 приложений – 20 страниц.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материал и методы исследования**

Дизайн исследования составлен в соответствии с его целью и задачами и состоял из поперечного (одномоментного) аналитического, проспективного анализа показателей функциональной активности нейтрофилов (нетоз, апоптоз, фагоцитоз, АФК- и NO-продуцирующая активность) у пациентов с ХРФ, РГИ и условно здоровых лиц-добровольцев (группа контроля).

Пациенты, включенные в исследование, наблюдались амбулаторно и/или проходили лечение в отделении иммунопатологии и аллергологии РНПЦ РМиЭЧ. Обследовано 103 пациента (62 женщины и 41 мужчина, в возрасте 38 лет (22; 37)) с ХРФ (МКБ-10: I02.0–8) тяжелого течения: 67 – в стадии ремиссии, 36 – в стадии обострения заболевания, продолжительность заболевания составляла от 1 года до 17 лет с частотой рецидивирования 6 и более раз в год, у 30 обследованных отмечалось непрерывно-рецидивирующее течение. Во вторую группу вошли 238 пациентов (211 женщин и 27 мужчин, в возрасте 34 лет (28; 41)) с РГИ (МКБ-10: B00.1, B00.2, B00.5, A60.0, A60.1) тяжелого течения: 166 – в стадии ремиссии, 72 – в стадии обострения заболевания, продолжительность заболевания составляла от 1 года до 19 лет с частотой рецидивирования 6 и более раз в год, у 72 обследованных отмечалось непрерывно-рецидивирующее течение. У 104 пациентов диагностирована РГИ внегенитальной локализации, у 62 – аногенитальная и сочетанная (аногенитальная и внегенитальная форма) локализация. Контрольную группу составили 73 практически здоровых человека (41 мужчина и 32 женщины, в возрасте 30 лет (24; 40)) из числа сотрудников РНПЦ РМиЭЧ и студентов ГомГМУ. Группы сформированы на основании информированного согласия пациентов и здоровых лиц в соответствии с этическими принципами Хельсинской Декларации 2013 г. Всем наблюдаемым пациентам проводилось комплексное лабораторное обследование: общеклинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, определение стандартных показателей иммунограммы. До-

полнительно осуществлялось бактериологическое исследование мазка из носа и/или ротоглотки на флору и чувствительность к антибиотикам у пациентов с ХРФ, определение IgM и IgG антител к вирусу простого герпеса 1, 2 типа в сыворотке крови пациентам с РГИ.

Методы исследования. Для оценки функционального статуса нейтрофилов определяли: нетоз по методу Долгушина И. И. (2010) в нашей модификации [1] в спонтанном (NETсп) и стимулированном (NETст) вариантах с расчетом индекса функционального резерва ( $ФР_{NET} = (NETст - NETсп) / NETст$ ); апоптоз методом двойного флуорохромирования (Cendoglo M., 1999) в спонтанном (Асп) и стимулированном (Аст) вариантах с расчетом индекса функционального резерва ( $ФР_A = Аст / Асп$ ); АФК-продуцирующую активность в спонтанном (НСТсп) и стимулированном (НСТст) вариантах НСТ-теста (Baehner R. L., Nathan D. G, 1967) с расчетом индекса функционального резерва ( $ФР_{АФК} = (НСТст - НСТсп) / НСТст$ ); NO-продуцирующую активность спектрофотометрическим методом (Crow J. P., 1999) в спонтанном (NOсп) и стимулированном (NOст) вариантах с расчетом индекса функционального резерва ( $ФР_{NO} = NOст / NOсп$ ); фагоцитарную (фагоцитарный индекс (ФИ), Маянский А. Н., 1989) и бактерицидную активность (фагоцитарное число (ФЧ), число микроорганизмов, подвергнувшихся внутриклеточному киллингу (ФЧкил), Cohen G., 1995) с расчетом индекса бактерицидной активности ( $БАН = ФЧкил / ФЧ$ ).

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программ статистического анализа «Statistica», 6.0 (StatSoft, GS-35F-5899H) и SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Минимальный объем выборки рассчитывали с помощью t-теста при мощности исследования 80%. Статистический анализ проводился с использованием непараметрических методов ввиду отсутствия согласия данных с нормальным распределением. Для оптимального представления о центральной тенденции, ширине и асимметрии показателей результаты выражали в формате Me (25%; 75%), где Me – медиана, 25% – нижний квартиль, 75% – верхний квартиль. За диапазон нормальных значений изучаемых показателей принимали интервал 25-й – 75-й перцентили значений здоровых лиц. Для оценки различий в двух независимых группах использовали ранговый U-критерий Манна-Уитни. Сравнение двух зависимых выборок проводилось с использованием W-критерия Вилкоксона. Анализ значимости различий по частоте встречаемости признаков проводился в таблицах сопряженности 2×2 с помощью точного критерия Фишера (F). Оценку линейных связей между переменными и их направленность проводили с применением корреляционного анализа по методу Спирмена ( $r_s$ ). Нулевую гипотезу при равенстве выборок отвергали при  $p < 0,050$ . Прогностическую значимость изучаемых показателей выявляли методом пошагового логистического регрессионного анализа, для оценки клинической информативности и выбора пороговых значений проводили ROC-анализ. Результаты выполненных исследований включены в Го-

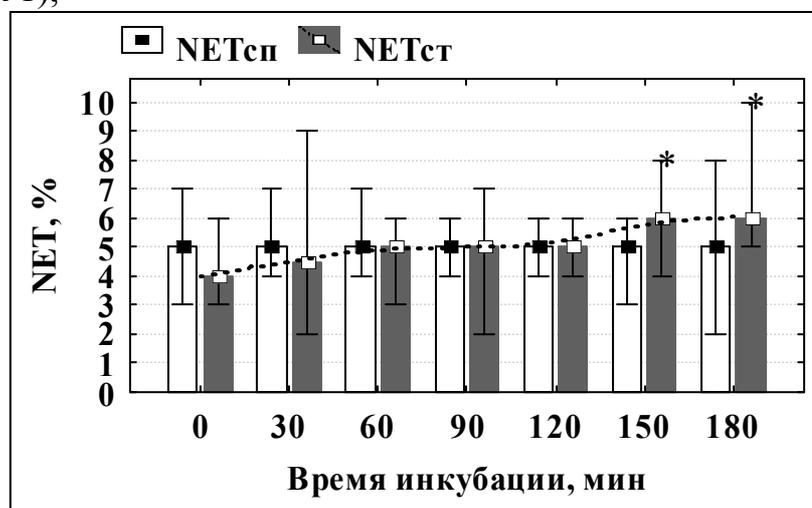
сударственный регистр информационных ресурсов (№ гос. регистрации 5761711304, 5761711306 от 13.03.2017).

### Результаты собственных исследований

**Оптимизация метода оценки нетоза.** Для разработки оптимальной клеточной системы, позволяющей количественно оценить формирование NET, нами был оптимизирован метод оценки нетоза. При этом установлено:

– уровень NET-образующей способности НГ ( $n = 7$ ), выделенных в градиенте плотности фиколл-верографин, значимо выше (10,0% (9,0; 11,0),  $p = 0,018$ , W-критерий Вилкоксона) по сравнению с аналогичным показателем при использовании нефракционированной лейкоцитарной суспензии, полученной путем отстаивания периферической крови (5,0% (4,0; 5,0));

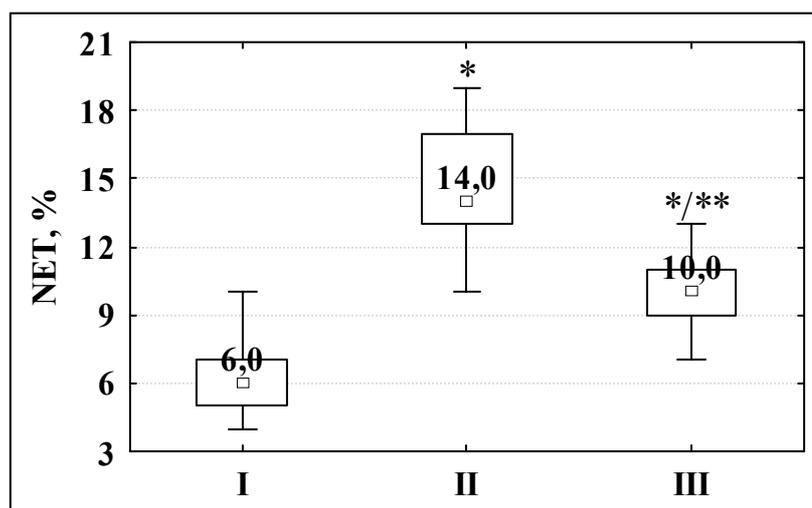
– в препаратах лейкоцитов крови здоровых лиц без стимуляции NET определялись в низком количестве (интерквартильный размах 3,0–7,0%). Дальнейшее культивирование НГ в условиях без стимулятора (NETсп) в течение от 30 до 180 минут не приводило к увеличению их NET-образующей активности. При внесении в культуру клеток инактивированных *S. aureus* (NETст) на 150 минуте инкубации наблюдался значимый прирост ( $p < 0,050$ , W-критерий Вилкоксона) количества NET в сравнении с результатами на 30–120 минутах. Увеличение времени инкубации более 150 минут не приводило к дальнейшему приросту количества NETст (рисунок 1);



\* – различия значимы в сравнении с показателем NETст при инкубации в течение 30–120 минут

**Рисунок 1.** – Уровень нетоза в зависимости от длительности инкубации ( $n = 22$ )

– секреторные продукты *S. aureus*, культивируемых в питательной среде RPMI-1640 в концентрации  $1 \times 10^8$  бактериальных клеток в 1 мл, обладали выраженным стимулирующим действием на способность НГ крови к образованию NET, превышающим индуцирующую способность инактивированных *S. aureus* (концентрация  $1 \times 10^8$  кл/мл), но менее выраженным, чем эффект живой взвеси *S. aureus* ( $p < 0,001$ , W-критерий Вилкоксона) (рисунок 2);



I – взвесь инактивированных *S. aureus*; II – взвесь живых *S. aureus*;  
III – секреторные продукты *S. aureus*;

\* – различия значимы относительно показателей I группы;

\*\* – различия значимы относительно показателей II группы.

Рисунок 2. – Уровень нетоза в зависимости от типа стимулятора (n = 22)

– сравнительный анализ уровня нетоза при окрашивании препаратов крови 0,04% водным раствором акридинового оранжевого с последующей флуоресцентной микроскопией ( $\lambda_{\text{возбуждения}} 490 \text{ нм}$ ;  $\lambda_{\text{эмиссии}} 520 \text{ нм}$ ;  $\times 1000$ ) относительно препаратов, окрашенных по Романовскому с последующей световой микроскопией ( $\times 1000$ ), показал отсутствие между ними значимых различий (W-критерий Вилкоксона);

– для установления референтных интервалов показателей нетоза нами была обследована группа практически здоровых лиц (n = 73), в качестве референтных пределов использовали интерквартильный размах. Для расширения возможностей оценки нетоза осуществляли параллельное определение спонтанного (NET<sub>сп</sub>) и стимулированного секреторными продуктами *S. aureus* (NET<sub>ст</sub>) уровня с последующим расчетом индекса функционального резерва (ФР<sub>NET</sub>) (таблица 1).

Таблица 1. – Показатели нетоза у здоровых взрослых лиц, n = 73

Показатель, единицы измерения	Me	25%–75%
NET <sub>сп</sub> , %	5,0	4,0–7,0
NET <sub>ст</sub> , %	10,0	9,0–12,0
ФР <sub>NET</sub> , ед.	0,5	0,4–0,5

Примечание – Me – медиана; 25%–75% – интерквартильный интервал

Полученные результаты послужили основанием для использования в дальнейших исследованиях нефракционированной лейкосуспензии периферической крови, культивируемой в течение 150 минут с секреторными продуктами *S. aureus* в качестве индуктора, одновременной постановкой теста в спонтанном и стимулированном вариантах с расчетом индекса функционального резерва, визуализацией NET путем окрашивания препаратов крови по Романовскому.

**Показатели функциональной активности нейтрофилов у пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом.** У пациентов с ХРФ в период клинической ремиссии, относительно значений здоровых лиц, наблюдались следующие изменения функционального статуса НГ (таблица 2): повышение способности к образованию NET в стимулированном тесте (NETст) и  $\Phi P_{NET}$  ( $p < 0,001$ ), снижение уровня апоптоза в стимулированном тесте (Аст,  $p = 0,045$ ), повышение уровня спонтанного НСТ-теста ( $p < 0,001$ ) при отсутствии значимых изменений стимулированного (НСТст), что приводило к снижению индекса  $\Phi P_{АФК}$  ( $p < 0,001$ ). NO-продуцирующая активность НГ у обследованных пациентов в спонтанном тесте (NOсп) была повышена ( $p = 0,008$ ), тогда как уровень NO в ответ на стимуляцию (NOст), напротив, снижался ( $p < 0,001$ ), в результате чего наблюдалось отсутствие NO-продуцирующего резерва НГ относительно значений группы контроля ( $p < 0,001$ ). По показателям фагоцитарной способности НГ (ФИ) пациентов и здоровых лиц различий не выявлено, а число активно перевариваемых микроорганизмов ( $\Phi Чкил$ ,  $p < 0,001$ ) и, соответственно, индекс БАН ( $p = 0,002$ ) оказались значимо ниже аналогичных параметров группы контроля.

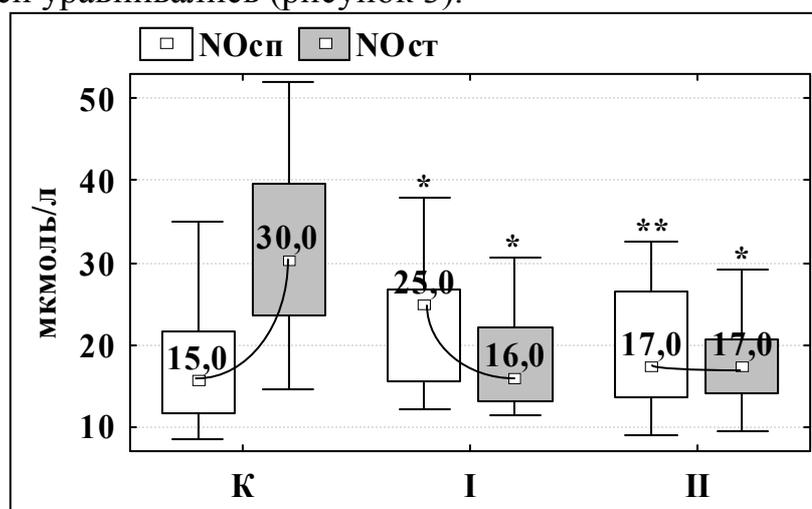
Таблица 2. – Функциональная активность нейтрофилов у пациентов с ХРФ в период клинической ремиссии

Показатель, единицы измерения	Здоровые лица n = 73	ХРФ, ремиссия n = 67
NETсп, %	5,0 (4,0; 7,0)	4,0 (2,0; 6,0)
NETст, %	10,0 (9,0; 12,0)	14,0 (12,0; 17,0)*
$\Phi P_{NET}$ , ед.	0,5 (0,4; 0,5)	0,7 (0,6; 0,8)*
Асп, %	11,0 (8,0; 14,0)	12,0 (9,0; 15,0)
Аст, %	31,0 (26,0; 34,0)	28,0 (24,0; 32,0)*
$\Phi P_A$ , ед.	0,6 (0,5; 0,7)	0,6 (0,5; 0,6)
НСТсп, %	7,0 (5,0; 10,0)	18,0 (15,0; 21,0)*
НСТст, %	52,0 (47,0; 57,0)	51,0 (48,0; 57,0)
$\Phi P_{АФК}$ , ед.	0,8 (0,8; 0,9)	0,6 (0,5; 0,7)*
NOсп, мкмоль/л	15,0 (12,0; 22,0)	20,0 (15,0; 26,0)*
NOст, мкмоль/л	30,0 (23,0; 40,0)	16,0 (13,0; 22,0)*
$\Phi P_{NO}$ , ед.	1,9 (1,6; 2,1)	0,9 (0,7; 1,0)*
ФИ, %	70,0 (64,0; 75,0)	70,0 (66,0; 76,0)
$\Phi Ч$	7,0 (5,0; 8,0)	7,0 (5,0; 8,0)
$\Phi Чкил$	5,0 (4,0; 5,0)	3,0 (2,0; 4,0)*
БАН, ед.	0,7 (0,6; 0,8)	0,4 (0,4; 0,7)*

Примечание – данные представлены в виде Ме (25%; 75%); \* – различия значимы относительно группы здоровых лиц ( $p < 0,050$ ; U критерий Манна-Уитни)

Сравнительный анализ функционального статуса НГ у пациентов с ХРФ с длительностью заболевания до двух лет (I группа, n = 34) и более 2 лет (II группа, n = 33) выявил однонаправленный характер изменений изучаемых показателей относительно значений здоровых лиц. В то же время, изменения параметров функциональной активности НГ пациентов с длительностью заболевания до 2 лет (I группа) были наиболее выраженными. Так, уровень спонтанной АФК-

продуцирующей активности НГ (НСТсп) был выше в сравнении как со здоровыми лицами ( $p < 0,001$ ), так и с пациентами II группы ( $p = 0,007$ ). Аналогичные изменения были характерны и для спонтанной NO-продуцирующей активности НГ: отмечался более высокий уровень NOсп как по отношению к значениям группы контроля ( $p < 0,001$ ), так и пациентов с длительностью заболевания более 2 лет ( $p = 0,031$ ). Кроме того, у пациентов с длительностью заболевания до 2 лет наблюдалась выраженная инверсия NO-продуцирующего ответа НГ при стимуляции (уровень NOст был ниже NOсп в 1,5 раза;  $p < 0,001$ , W-критерий Вилкоксона), а при длительности заболевания более 2 лет инверсия исчезала, значения показателей NOст и NOсп уравнивались (рисунок 3).



К – контрольная группа здоровых лиц; I – пациенты с длительностью ХРФ  $\leq 2$  лет ( $n = 34$ );

II – пациенты с длительностью ХРФ  $> 2$  лет ( $n = 33$ );

\* – различия значимы относительно группы контроля;

\*\* – различия значимы при сравнении I и II групп.

**Рисунок 3. – Показатели NO-продуцирующей активности НГ крови пациентов в зависимости от длительности ХРФ**

Показатели апоптоза НГ в стимулированном тесте (Аст) у пациентов с длительностью ХРФ до 2 лет был ниже в сравнении со значениями здоровых лиц ( $p = 0,045$ ), тогда как у пациентов II группы – соответствовал референтному диапазону. Характер изменений показателей нетоза и фагоцитоза НГ у пациентов обеих групп был одинаковым и соответствовал таковому в основной группе обследованных с ХРФ.

При обострении ХРФ у пациентов наблюдалось повышение уровня NETст, ( $p < 0,001$ ) с одновременным снижением параметров апоптоза НГ (Асп,  $p = 0,001$ ; Аст,  $p = 0,004$ ) в сравнении с аналогичными показателями периода ремиссии. Уровень БАН, сниженный в ремиссии заболевания, повышался до контрольных значений при обострении процесса. В результате различие по данному показателю между сравниваемыми группами пациентов оказалось статистически значимо ( $p = 0,003$ ). У пациентов с ХРФ, но не у здоровых лиц, обнаружены обратная кор-

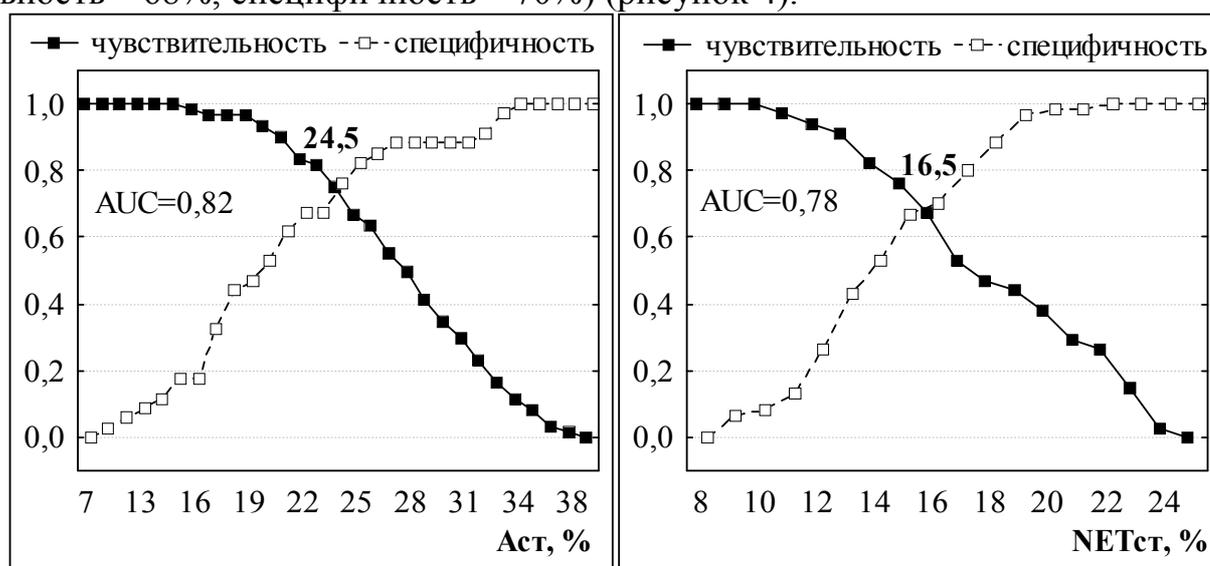
реляция между показателями апоптоза и бактерицидной активности НГ (Асп↔БАН;  $r_s = -0,41$ ,  $p = 0,024$ ), но прямая корреляция между показателями нетоза и бактерицидной активностью НГ (БАН↔NETст;  $r_s = 0,41$ ,  $p = 0,023$ ).

Учитывая выявленные различия показателей нетоза (NETст) и апоптоза (Аст) НГ у пациентов с ХРФ в зависимости от стадии заболевания, мы оценили возможность их использования для характеристики полноты ремиссии фурункулеза. Показано, что наибольший вклад в оценку полноты ремиссии вносит показатель Аст, несколько меньший – NETст (таблица 3).

Таблица 3. – Прогностическая значимость показателей нетоза и апоптоза нейтрофилов для оценки полноты ремиссии ХРФ

Показатель	B	Стандартная ошибка	Критерий Вальда	Критерий значимости
Аст, %	-0,21	0,05	15,0	< 0,001
NETст, %	0,32	0,09	11,0	0,001

При этом оптимальные пороговые значения составили для Аст – 24,5% (чувствительность – 75%, специфичность – 77%), для NETст – 16,5% (чувствительность – 68%, специфичность – 70%) (рисунок 4).



По оси ординат отложены значения чувствительности и специфичности (в ед.); по оси абсцисс – значения показателей функционального статуса нейтрофилов

**Рисунок 4. – Точка баланса между чувствительностью и специфичностью по результатам ROC анализа показателей Аст и NETст у пациентов с ХРФ**

По нашим расчётам, значения  $Аст \geq 24,5\%$ , а  $NETст < 16,5\%$  указывает на полную ремиссию заболевания, в противном случае констатируется наличие неполной ремиссии ХРФ. Построенная модель обладает достаточно высокой специфичностью (95%) и несколько меньшей чувствительностью (59%), что обеспечивает диагностическую эффективность на уровне 82%. Прогностическая ценность положительного результата составляет 87%, прогностическая ценность отрицательного результата – 80%.

Таким образом, изменения функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ХРФ в стадии ремиссии носят комплексный характер со значимым отклонением показателей нетоза, апоптоза, АФК- и NO-продуцирующих свойств. Параметры нетоза и апоптоза могут быть использованы для оценки полноты ремиссии ХРФ.

**Показатели функциональной активности нейтрофилов у пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией.** У пациентов с РГИ в период клинической ремиссии наблюдалось значимое увеличение уровня NETст и, как следствие, повышение индекса функционального резерва ( $\Phi P_{NET}$ ) в сравнении со значениями здоровых лиц ( $p < 0,001$ ). Изменения показателей апоптоза НГ при РГИ проявлялись снижением Асп и Аст ( $p < 0,001$ ) относительно группы контроля. АФК-продуцирующая активность НГ, в сравнении со значениями группы контроля у обследованных лиц с РГИ повышалась в спонтанном тесте (НСТсп), но не изменялась в стимулированном (НСТст), что привело к снижению  $\Phi P_{АФК}$  ( $p < 0,001$ ). Показатели генерации NO в спонтанном тесте не изменялись, тогда как уровень NO-продуцирующей активности при стимуляции (НОст), и, соответственно, индекс  $\Phi P_{NO}$ , оказались значимо ниже ( $p < 0,001$  относительно здоровых лиц). По показателям фагоцитарной (ФИ) и бактерицидной (ФЧкил, БАН) активности НГ различий между пациентами с РГИ и здоровыми лицами не выявлялось. Полученные данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Функциональная активность нейтрофилов у пациентов с РГИ в период клинической ремиссии

Показатель, единицы измерения	Здоровые лица n = 73	РГИ, ремиссия n = 166
NETсп, %	5,0 (4,0; 7,0)	3,0 (2,0; 5,0)
NETст, %	10,0 (9,0; 12,0)	15,0 (13,0; 19,0)*
$\Phi P_{NET}$ , ед.	0,5 (0,4; 0,5)	0,8 (0,7; 0,9)*
Асп, %	11,0 (8,0; 14,0)	7,0 (6,0; 9,0)*
Аст, %	31,0 (26,0; 34,0)	24,0 (21,0; 27,0)*
$\Phi P_A$ , ед.	0,6 (0,5; 0,7)	0,7 (0,6; 0,7)
НСТсп, %	7,0 (5,0; 10,0)	18,0 (15,0; 21,0)*
НСТст, %	52,0 (47,0; 57,0)	52,0 (46,0; 56,0)
$\Phi P_{АФК}$ ед.	0,8 (0,8; 0,9)	0,6 (0,6; 0,7)*
НОсп, мкмоль/л	15,0 (12,0; 22,0)	16,0 (13,0; 22,0)
НОст, мкмоль/л	30,0 (23,0; 40,0)	15,0 (13,0; 19,0)*
$\Phi P_{NO}$ , ед.	1,9 (1,6; 2,1)	0,9 (0,8; 1,0)*
ФИ, %	70,0 (64,0; 75,0)	70,0 (64,0; 77,0)
ФЧ	7,0 (5,0; 8,0)	7,0 (5,0; 9,0)
ФЧкил	5,0 (4,0; 5,0)	5,0 (4,0; 6,0)
БАН, ед.	0,7 (0,6; 0,8)	0,7 (0,6; 0,8)

Примечание – данные представлены в виде Ме (25%; 75%); \* – различия значимы относительно группы здоровых лиц ( $p < 0,050$ ; U критерий Манна-Уитни)

Описанные изменения функциональной активности НГ у пациентов с РГИ не зависели от длительности заболевания, за исключением NO-продуцирующей

активности. У пациентов с давностью РГИ до 2 лет ( $n = 87$ ) выявлен повышенный уровень генерации NO (NOсп) как по отношению к показателям здоровых лиц ( $p = 0,048$ ), так и значениям у пациентов с более длительным течением заболевания ( $n = 79$ ;  $p = 0,018$ ). Кроме того, при давности РГИ до 2 лет обнаружен инверсный NO-продуцирующий ответ НГ при стимуляции (низкий уровень NOост относительно повышенного NOсп,  $p = 0,009$ , W-критерий Вилкоксона).

Максимальная способность НГ к нетозу в ответ на стимуляцию *in vitro* (NETст) выявлена у пациентов с аногенитальной и сочетанной формой РГИ (19,0% (17,0; 22,0)) относительно группы с внегенитальной локализацией герпетических высыпаний (14,0% (12,0; 15,0),  $p < 0,001$ ). Кроме того, у пациентов с аногенитальной и сочетанной локализацией герпетических высыпаний наблюдалась выраженная инверсия NO-продуцирующей активности НГ в стимулированном тесте (уровень NOост был значимо ниже NOсп;  $p < 0,001$ , W-критерий Вилкоксона), в то время как у пациентов с внегенитальной локализацией инверсии не наблюдалось, значения показателей NOост и NOсп были равнозначны.

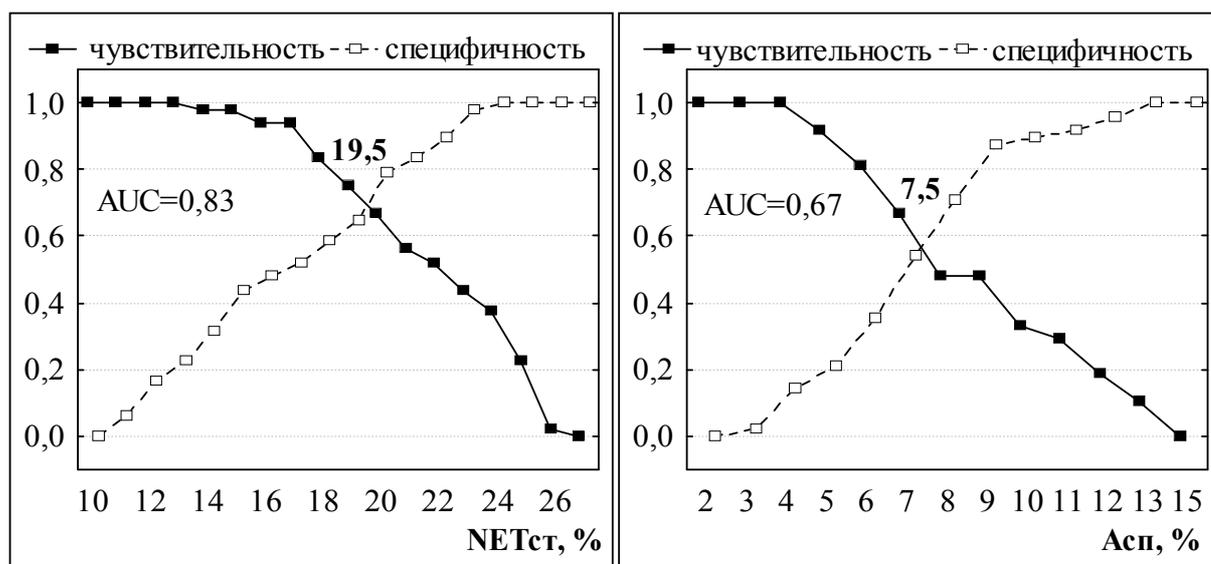
При обострении РГИ вектор изменений показателей функционального статуса НГ, выявленный и описанный нами выше у пациентов в период ремиссии (таблица 4), сохранялся, однако выраженность изменений показателей нетоза и апоптоза НГ возрастала. Так, в период рецидива РГИ выявлено значимое, в сравнении с данными в ремиссии, повышение уровня NETст (21,0% (18,0; 24,0),  $p < 0,001$ ). Уровень апоптоза НГ в спонтанном тесте (Асп) у пациентов в обострении РГИ был значимо выше относительно аналогичных показателей в ремиссии заболевания (8,0% (7,0; 12,0),  $p < 0,001$ ).

Нами исследована возможность использования показателей Асп и NETст для оценки полноты ремиссии РГИ, при этом наибольший вклад в значение зависимой переменной (полнота ремиссии) вносил показатель NETст, несколько меньший – Асп (таблица 5).

Таблица 5. – Прогностическая значимость показателей нетоза и апоптоза нейтрофилов для оценки полноты ремиссии РГИ

Показатель	В	Стандартная ошибка	Критерий Вальда	Критерий значимости
NETст, %	0,37	0,08	21,0	< 0,001
Асп, %	0,31	0,11	7,9	0,005

Исходя из точки баланса между чувствительностью и специфичностью, мы определили пороговые значения по анализируемым показателям функционального статуса НГ: для показателя NETст – 19,5% (чувствительность – 75%, специфичность – 65%) и для Асп – 7,5% (чувствительность – 67%, специфичность – 54%) (рисунок 5).



По оси ординат отложены значения чувствительности и специфичности (в ед.); по оси абсцисс – значения показателей функционального статуса нейтрофилов

**Рисунок 5. – Точка баланса между чувствительностью и специфичностью по результатам ROC анализа показателей NETст и Асп у пациентов с РГИ**

Уровень NETст < 19,5% и Асп < 7,5% является критерием полноты ремиссии РГИ, в противном случае констатируют наличие неполной ремиссии заболевания. Диагностическая эффективность построенной модели составляет 81%, при этом специфичность составляет 83%, чувствительность 79%. Прогностическая ценность положительного результата – 83%, прогностическая ценность отрицательного результата – 80%.

Как показали проведенные исследования, изменения функциональной активности НГ у пациентов с ХРФ (таблица 2) и РГИ (таблица 4) в стадии ремиссии во многом сходны: отмечается повышение спонтанной АФК-продуцирующей активности на фоне инверсии продукции NO и увеличения уровня нетоза в стимулированном тесте с одновременным торможением процессов апоптоза. В то же время в период обострения выявлены различия: при ХРФ отмечается снижение уровня апоптоза (Асп,  $p = 0,001$ ; Аст,  $p = 0,004$ ) относительно аналогичных значений в стадии ремиссии, а у пациентов с РГИ, напротив, спонтанный уровень апоптоза повышается ( $p < 0,001$ ), хотя и не достигает значений здоровых лиц.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Разработан метод оценки NET-образующей активности нейтрофилов крови, основанный на инкубации в течение 150 минут нефракционированной лейкоцитарной суспензии, использовании секреторных продуктов *S. aureus* в качестве индуктора, одновременной постановкой теста в спонтанном и стимулированном вариантах с расчетом индекса функционального резерва, визуализацией NET путем окрашивания препаратов по Романовскому. Метод обладает хорошей воспроизводимостью результатов, позволяет значительно снизить трудоемкость исследования, не требует дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Определен референтный диапазон значений показателей нетоза в спонтанном (5,0% (4,0–7,0)) и стимулированном вариантах (10,0% (9,0–12,0)) [1, 2, 5, 7, 8, 9, 13, 17, 19, 20, 22, 23, 26].

2. У пациентов с тяжелым течением ХРФ в период клинической ремиссии наблюдается повышение способности нейтрофильных гранулоцитов к нетозу (NETст,  $p < 0,001$ ), но снижение интенсивности апоптоза в ответ на стимуляцию *in vitro* (Аст,  $p = 0,045$ ), одновременно выявлено увеличение генерации нейтрофилами радикалов кислорода (НСТсп,  $p < 0,001$ ) и азота (НОсп,  $p = 0,008$ ) с истощением резерва NO-продуцирующей активности (НОст,  $p < 0,001$ ) относительно значений здоровых лиц. Максимальная степень изменений показателей апоптоза, АФК- и NO-продуцирующей активности нейтрофилов, но не нетоза, характерна для пациентов с длительностью ХРФ до 2-х лет. В период обострения ХРФ, относительно клинической ремиссии, отмечается максимальное увеличение способности стимулированных нейтрофилов к нетозу (NETст,  $p < 0,001$ ) на фоне выраженного снижения показателей апоптоза (Аст,  $p = 0,004$ ; Асп,  $p = 0,001$ ). Только при обострении воспалительного процесса показатели нетоза и апоптоза ассоциированы с бактерицидной активностью нейтрофилов (NETст↔БАН,  $r_s = 0,41$ ,  $p = 0,023$ ; Асп↔БАН  $r_s = -0,41$ ,  $p = 0,024$ ) [4, 6, 11, 12, 13, 14, 18, 24, 26].

3. У пациентов с тяжелым течением РГИ в стадии клинической ремиссии выявлено повышение способности нейтрофилов к образованию NET в ответ на стимуляцию *in vitro* (NETст,  $p < 0,001$ ) наряду с подавлением интенсивности апоптоза (Асп, Аст,  $p < 0,001$ ), увеличением базальной генерации радикалов кислорода (НСТсп,  $p < 0,001$ ) и истощением резерва NO-продуцирующей активности (НОст,  $p < 0,001$ ) относительно значений группы контроля. Максимальная степень повышения уровня нетоза (NETст) характерна для пациентов с аногенитальной и сочетанной локализацией герпетических высыпаний, а также в период обострения процесса ( $p < 0,001$ ). Изменения уровня продукции нейтрофилами NO, проявляющиеся инверсной реакцией на стимуляцию, преобладают у пациентов с аногенитальной и сочетанной формами РГИ ( $p < 0,001$ ), и с длительностью

заболевания до 2 лет ( $p = 0,009$ ). При обострении РГИ уровень апоптоза в спонтанном тесте (Асп) в сравнении с периодом ремиссии повышается ( $p < 0,001$ ) [3, 6, 10, 11, 15, 16, 21].

4. Показатели нетоза и апоптоза нейтрофилов являются информативными лабораторными критериями полноты ремиссии: у пациентов с ХРФ наличие полной ремиссии наблюдается при значениях  $NET_{ст} < 16,5\%$  и  $Аст \geq 24,5\%$  (диагностическая эффективность 82%, прогностическая ценность положительного результата 87%, прогностическая ценность отрицательного результата 80%), а у пациентов с РГИ – при значениях  $NET_{ст} < 19,5\%$  и  $Асп < 7,5\%$  (диагностическая эффективность 81%, прогностическая ценность положительного результата 83%, прогностическая ценность отрицательного результата 80%) [6, 25].

5. Характер изменений показателей нетоза, апоптоза, АФК- и НО-продуцирующей активности нейтрофилов у пациентов с ХРФ и РГИ в стадии клинической ремиссии однотипен, однако в период обострения воспалительного процесса при ХРФ выявляется снижение уровня апоптоза (Асп,  $p = 0,001$ ; Аст,  $p = 0,004$  относительно ремиссии), а у пациентов с РГИ, напротив, спонтанный уровень апоптоза нейтрофилов повышается (Асп,  $p < 0,001$  относительно периода ремиссии), хотя и не достигает значений здоровых лиц [3, 4, 6].

#### **Рекомендации по практическому использованию результатов диссертации**

1. Разработан и рекомендован к практическому применению метод количественного определения нетоза в спонтанном и стимулированном вариантах, позволяющий повысить клиническую информативность лабораторной оценки функционального статуса нейтрофилов при ХРФ и РГИ [1, 25, 26].

2. В комплекс показателей функционального статуса нейтрофилов целесообразно включать определение параметров нетоза и апоптоза для оценки полноты ремиссии у пациентов с ХРФ и РГИ с целью иммунологического мониторинга и дальнейшего проведения иммуотропной терапии [25].

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Гусакова, Н. В. Образование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – Т. 29, № 3. – С. 27–31.

2. Новикова, И. А. Особенности функциональной активности нейтрофилов у пациентов с локальными инфицированными ранами / И. А. Новикова, Н. В. Гусакова // Инфекции в хирургии. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 7–11.

3. Гусакова, Н. В. Функциональная активность нейтрофилов при хронической рецидивирующей герпетической инфекции / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 169–176.

4. Новикова, И. А. Комплексная оценка функциональной активности нейтрофилов при хроническом рецидивирующем фурункулезе / И. А. Новикова, Н. В. Гусакова, А. В. Гомоляко // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 81–88.

5. Гусакова, Н. В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: биологическая роль, методы определения / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 96–104.

6. Гусакова, Н. В. Функциональный статус нейтрофилов у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями различной этиологии / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 48–53.

### Статьи в научных сборниках и материалах конференций

7. Гусакова, Н. В. Оценка способности нейтрофилов крови здоровых лиц к образованию экстрацеллюлярных сетей / Н. В. Гусакова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. III Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 28–29 апр. 2011 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2011. – Т. 1. – С. 125–127.

8. Гусакова, Н. В. Методы обнаружения нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей / Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 21-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 16–17 февр. 2012 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2012. – Т. 1. – С. 181–183.

9. Гусакова, Н. В. Оценка спонтанной и индуцированной формы гибели нейтрофилов здоровых лиц / Н. В. Гусакова, К. С. Макеева // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. IV Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 19–20 апр. 2012 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2012. – Т. 1. – С. 169–171.

10. Гусакова, Н. В. NET-образующая активность нейтрофилов при хронической рецидивирующей герпетической инфекции / Н. В. Гусакова, А. С. Прокопович // Чернобыльские чтения – 2012: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гомель, 19–20 апреля 2012 г. / Респ. науч.-практ. центр радиационной медицины и экологии человека; под общ. ред. А. В. Рожко. – Гомель: РНПЦ РМиЭЧ, 2012. – С. 135–137.

11. Гусакова, Н. В. Оценка параметров апоптоза и нетоза нейтрофилов у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями / Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 22-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 14–15 нояб. 2013 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2013. – Т. 1. – С. 195–198.

12. Гусакова, Н. В. Состояние бактерицидного потенциала фагоцитов у пациентов с хроническим рецидивирующим фурункулезом / Н. В. Гусакова, Е. С. Давыдова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. VI Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 23–24 апр. 2014 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2014. – Т. 1. – С. 103–104.

13. Гусакова, Н. В. Метод оценки состояния врожденной резистентности организма / Н. В. Гусакова, И. А. Новикова // Достижения медицинской науки Беларуси: рецензир. науч.-практ. ежегодник. Вып. 19. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ. науч. мед. б-ка»; редкол.: В. И. Жарко [и др.]. – Минск: ГУ «РНМБ», 2014. – С. 146–147.

14. Гусакова, Н. В. Показатели функциональной активности нейтрофилов в зависимости от длительности хронического рецидивирующего фурункулеза / Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 23-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 13–14 нояб. 2014 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2014. – Т. 1. – С. 174–177.

15. Апанович, В. О. Параметры апоптоза и нетоза нейтрофилов у пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией в динамике процесса / В. О. Апанович, Н. В. Гусакова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. VII Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 23–24 апр. 2015 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2015. – Т. 1. – С. 32–34.

16. Апанович, В. О. Состояние бактерицидного потенциала фагоцитов у пациентов с рецидивирующей герпетической инфекцией / В. О. Апанович, Н. В. Гусакова // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. VIII Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых

ученых, Гомель, 28 апр. 2016 г.: в 4 т. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2016. – Т. 1. – С. 43–44.

17. Гусакова, Н. В. NET-образующая активность лейкоцитов в зависимости от способа выделения / Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 26-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 3–4 нояб. 2016 г. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2016. – С. 225–227.

18. Гомоляко, А. В. Продукция NO лейкоцитами крови при фурункулезе / А. В. Гомоляко, Н. В. Гусакова // Актуальные проблемы медицины: сб. науч. ст. Респ. науч.-практ. конф. и 26-й итоговой науч. сессии Гомел. гос. мед. ун-та, Гомель, 3–4 нояб. 2016 г. / Гомел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. Н. Лызиков [и др.]. – Гомель: ГомГМУ, 2016. – С. 188–191.

#### **Тезисы докладов**

19. Новикова, И. А. Влияние живой и инактивированной суточной культуры *S. aureus* на формирование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови / И. А. Новикова, Н. В. Гусакова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 9. – С. 42.

20. Гусакова, Н. В. Влияние *S. aureus* на формирование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови / Н. В. Гусакова // Сучасні аспекти медицини і фармації–2010: тези доповідей 71 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, Запорожжє, 13–14 мая 2011 г. / Запорожский гос. мед. ун-т; редкол.: Ю. М. Колесников [и др.]. – Запорожжє, 2011. – Вып. XXIV, № 2. – С. 92–93.

21. Гусакова, Н. В. Функциональная активность нейтрофилов при хронической рецидивирующей герпетической инфекции / Н. В. Гусакова // Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, Запорожжє, 19–20 апр. 2012 г. / Запорожский гос. мед. ун-т; редкол.: Ю. М. Колесников [и др.]. – Запорожжє, 2012. – № 2 (9). – С. 71–72.

22. Gusakova, N. NET-forming activity of neutrophils in patients with local infected wounds (LIW) / N. Gusakova, A. Makanin // The EWMA Journal Supplement. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 84.

23. Yarets, Y. Standard and apparatus methods of pre-procedural chronic wound treatment: dynamic of neutrophils function / Y. Yarets, N. Gusakova, J. Zubkova // The EWMA Journal Supplement. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 90.

24. Гусакова, Н. В. NET-образующая активность нейтрофилов при хроническом рецидивирующем фурункулезе / Н. В. Гусакова // Актуальные вопросы современной медицины: сб. тезисов междунар. науч. конф. студентов и молодых ученых Харьковского нац. ун-та им. В. Н. Каразина, Харьков, 18–19 апр. 2013 г. / Харьковский нац. ун-т им. В. Н. Каразина. – Харьков, 2013. – С. 138.

**Инструкция по применению**

25. Метод оценки состояния ремиссии герпетической инфекции: инструкция по применению: утв. 16.12.2016, № 115-1216 / А. П. Саливончик, А. В. Рожко, Н. В. Гусакова, А. В. Гомоляко, Ю. И. Ярец, Н. И. Шевченко; М-во здравоохранения Республики Беларусь, Респ. науч.-практ. центр радиационной медицины и экологии человека – Гомель, 2016. – 8 с.

**Заявки на изобретение**

26. Способ оценки состояния врожденной резистентности организма: заявка ВУ20140136/Н. В. Гусакова, И. А. Новикова, Н. И. Шевченко. – Опубл. 30.10.2015.



## РЭЗІЮМЭ

**Гусакова Наталля Віктараўна**

### **Нетоз і іншыя праявы функцыянальнай актыўнасці нейтрафілаў пры хранічных рэцыдывавальных інфекцыях**

**Ключавыя словы:** хранічны рэцыдывавальны фурункулёз (ХРФ), рэцыдывавальны герпетычная інфекцыя (РГІ), нетоз, функцыянальная актыўнасць нейтрафілаў.

**Аб'ект даследавання:** перыферычная кроў (нейтрафілы) здаровых асоб і пацыентаў з ХРФ і РГІ.

**Прадмет даследавання:** паказчыкі функцыянальнай актыўнасці нейтрафілаў.

**Мэта даследавання:** абгрунтаваць прымяненне ацэнкі нетоза ў комплексе з іншымі функцыянальнымі параметрамі нейтрафілаў крыві для іммуналагічнай дыягностыкі і маніторынгу працякання хранічных рэцыдывавальных інфекцый бактэрыяльнай і віруснай этыялогіі.

**Метады даследавання:** іммуналагічныя, біяхімічныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Распрацаваны і аптымізаваны для выкарыстання ў клінічнай практыцы метады ацэнкі нетозу ў перыферычнай крыві. Абгрунтавана мэтазгоднасць уключэння паказчыкаў нетозу ў комплекснае даследаванне функцыянальнага статусу нейтрафілаў пацыентаў з ХРІ бактэрыяльнай і віруснай этыялогіі. Упершыню выяўлена падвышаная здольнасць нейтрафілаў крыві да нетозу ў пацыентаў з ХРФ і РГІ цяжкага цяжэння, а таксама залежнасць актыўнасці NET-прадукцыі ад стадыі захворвання (рэмісія, абвастрэнне). Выяўлена падабенства змяненняў функцыянальных уласцівасцяў нейтрафілаў крыві (павышэнне АФК-прадуючай актыўнасці на фоне інверсіі ўтварэння NO і павелічэнне ўзроўню нетоза з адначасовым тармажэннем працэсаў апаптозу) у межрэцыдыўны перыяд у пацыентаў з хранічнымі рэцыдывавальнымі інфекцыямі віруснай і бактэрыяльнай прыроды. Даказана, што паказчыкі нетозу і апаптозу нейтрафілаў крыві з'яўляюцца адэкватнымі лабараторнымі маркерамі паўнаты рэмісіі ў пацыентаў з хранічнымі рэцыдывавальнымі інфекцыямі.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** ацэнка паўнаты рэмісіі ў пацыентаў з ХРФ і РГІ, лабараторная дыягностыка і маніторынг працякання іммуналагічнай недастатковасці.

**Галіна прымянення:** клінічная і эксперыментальная іммуналогія, клінічная лабараторная дыягностыка, інфекцыйныя хваробы, дэрматалогія.

## РЕЗЮМЕ

**Гусакова Наталья Викторовна**

### **Нетоз и другие проявления функциональной активности нейтрофилов при хронических рецидивирующих инфекциях**

**Ключевые слова:** нетоз, функциональная активность нейтрофилов, хронический рецидивирующий фурункулез (ХРФ), рецидивирующая герпетическая инфекция (РГИ).

**Объект исследования:** периферическая кровь (нейтрофилы) здоровых лиц и пациентов с ХРФ и РГИ.

**Предмет исследования:** показатели функциональной активности нейтрофилов.

**Цель исследования:** обосновать применение оценки нетоза в комплексе с другими функциональными параметрами нейтрофилов крови для иммунологической диагностики и мониторинга течения хронических рецидивирующих инфекций бактериальной и вирусной этиологии.

**Методы исследования:** иммунологические, биохимические.

**Полученные результаты и их новизна.** Разработан и оптимизирован для внедрения в клиническую практику метод оценки нетоза в периферической крови. Обоснована целесообразность включения показателей нетоза в комплексное исследование функционального статуса нейтрофилов пациентов с ХРИ бактериальной и вирусной этиологии. Впервые обнаружена повышенная способность нейтрофилов крови к нетозу у пациентов с ХРФ и РГИ тяжелого течения, а также зависимость NET-образующей активности от стадии заболевания (ремиссия, обострение). Выявлено сходство изменений функциональных свойств нейтрофилов крови (повышение АФК-продуцирующей активности на фоне инверсии образования NO и увеличение уровня нетоза с одновременным торможением процессов апоптоза) в межрецидивный период у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями бактериальной и вирусной этиологии. Доказано, что показатели нетоза и апоптоза нейтрофилов крови являются адекватными лабораторными маркерами полноты ремиссии у пациентов с хроническими рецидивирующими инфекциями.

**Рекомендации по использованию:** оценка полноты ремиссии у пациентов с ХРФ и РГИ, лабораторная диагностика и мониторинг течения иммунологической недостаточности.

**Область применения:** клиническая и экспериментальная иммунология, клиническая лабораторная диагностика, инфекционные болезни, дерматология.

## SUMMARY

**Husakova Natallia Viktorovna**

### **Netosis and other manifestations of the functional activity of neutrophils in chronic recurrent infections**

**Key words:** chronic recurrent furunculosis (CRF), recurrent herpetic infection (RHI), netosis, functional activity of neutrophils.

**Object of the study:** peripheral blood neutrophils of healthy individuals and patients with CRF and RHI.

**The subject of the study:** functional activity of the neutrophils.

**The aim of the study** was to substantiate the application of the netosis in combination with other functional activity of neutrophils for immunological diagnosis and monitoring of the course of chronic recurrences infections bacterial and viral etiology.

**Methods:** immunological, biochemical.

**Obtained results and their novelty.** Netosis evaluation method has been developed and optimized for introduction into clinical practice. It is shown that it is necessary to include netosis in complex study of the functional activity of neutrophils in patients with CRI bacterial and viral etiology. For the first time, an increased ability of blood neutrophils to the netosis in patients with severe CRF and RHI as well as the dependence NET-forming activity on the disease stage (remission and exacerbation). The similarity of changes in the functional properties of blood neutrophils during the exacerbation in patients with chronic recurrent infections was revealed (increased ROS-producing activity with inversion of NO generation and increased netosis with simultaneous inhibition of apoptosis). It has been proved that the levels of netosis and apoptosis of blood neutrophils are adequate laboratory markers of remission completeness in patients with chronic recurrent infections.

**Recommendations for use:** assessment of the completeness of remission in patients with CRF and RHI, laboratory diagnostics and monitoring of the course of immune deficiency.

**Field of application:** clinical and experimental immunology, clinical laboratory diagnostics, infectious diseases, dermatology.

Научное издание

**ГУСАКОВА**  
**НАТАЛЬЯ ВИКТОРОВНА**

**НЕТОЗ И ДРУГИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ  
РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ИНФЕКЦИЯХ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук  
по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

Подписано в печать 8.09.2017г  
Формат 60x84V<sub>16</sub>. Бумага офсетная 80 г/м<sup>2</sup>. Гарнитура «Таймс» Ризография.  
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,48.  
Тираж 60 экз. Заказ № 192р от 3.10.2017 г

Отпечатано с оригинал макет заказчика  
УО «Белорусский торгово-экономический университет потребительской кооперации»  
г.Гомель, проспект Октября, 50, 246029