

УДК 616.155.34:616.01-036.12

Новикова И.А., Мелеш Т.Н., Зыблев С.Л.

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь

## Функциональный статус нейтрофилов и про-/антиоксидантный баланс крови у пациентов с хронической болезнью почек

### Введение

Хроническая болезнь почек (ХБП) в настоящее время является серьезной медико-социальной проблемой. Иммуные механизмы играют важную роль в патогенезе ХБП, а на более поздних стадиях заболевания вносят свой вклад в его прогрессирование. Дисфункция различных факторов врожденного и адаптивного иммунитета при ХБП продемонстрирована рядом авторов [1].

Известна лидирующая роль нейтрофилов (Нф) в развитии и поддержании воспалительных и аутоиммунных реакций. В настоящее время описан новый механизм реализации их функции – образование внеклеточных сетеподобных структур (neutrophil extracellular traps – NET, нетоз), состоящих из ядерной ДНК, гистонов, белков и ферментов гранул [2]. Нейтрофильные сети способны к захвату и киллингу различных патогенов, дополняя другие проявления бактерицидного потенциала нейтрофилов; участвуют в реализации процессов тромбообразования в мелких сосудах и других реакциях организма [3]. Проявления реактивности Нф в ряде случаев сопровождаются активацией свободно–радикального окисления, которое при недостаточности факторов антиоксидантной защиты вносит свой вклад в неиммунные механизмы прогрессирования ХБП [4].

#### **Цель**

Изучить изменения функциональных свойств нейтрофилов и про/антиоксидантного баланса крови при хронической болезни почек.

#### **Материалы и методы исследования**

Обследовано 30 пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии, стоящих в листе ожидания на пересадку почки. Контрольную группу составили 36 практически здоровых лиц сопоставимых по возрасту и полу.

Материалом для исследования служили плазма и лейкоциты периферической венозной крови. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной (10 Ед/мл) крови в течение 45 минут при 37 °С. Функциональный статус нейтрофилов (Нф) оценивали по комплексу показателей: способность к фагоцитозу, кислород-продуцирующая активность, образование внеклеточных сетей (NET). Поглотительную способность Нф определяли в реакции с инактивированным нагреванием *S. aureus*, подсчитывая фагоцитарный индекс (ФИ, процент фагоцитирующих Нф) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее число частиц в одном фагоците). Кислород-продуцирующую активность Нф оценивали в реакции восстановления нитросинеготетразолия (НСТ-тест) в спонтанном (НСТсп) и стимулированном (НСТст) вариантах с микроскопической оценкой результата [5]. Формирование NET учитывали по методике И.И. Долгушина в нашей модификации [6] после инкубации лейкоцитов в течение 30 и 150 минут при 37 °С в фосфатно–солевом буфере без стимулятора (спонтанный уровень, NETсп) и в присутствии инактивированных нагреванием *S. aureus* (стимулированный уровень, NETст). Далее клеточную суспензию наносили на предметное стекло, окрашивали по Романовскому–Гимзе с последующей микроскопией. В качестве NET расценивали тонкие свободнолежащие нити сине–фиолетового цвета. Подсчитывали количество NET на 200 нейтрофилов, результат выражали в процентах.

В плазме крови оценивали состояние про–/антиоксидантной системы методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). С целью стандартизации использовали подход, основанный на сравнении интенсивности ЛЗХЛ радикал-образующей системы в отсутствие (контроль) и в присутствии биологического материала (опыт). Радикал-образующая смесь включала трисбуфер (рН=8,8), 25 ммоль/л раствор сернокислого закисного железа, 0,1% раствор люминола и 3% раствор перекиси водорода. Регистрацию результатов ЛЗХЛ осуществляли в течение 5 минут на флюориометре/спектрофотометре CaryEclipse FL1002M003 (Variant, USA) с автоматическим определением максимальной интенсивности свечения (Imax) и светосуммы хемилюминесценции (S). Результаты исследования представляли как степень подавления показателей ХЛ (в процентах) по отношению к значениям ЛЗХЛ радикалообразующей смеси в отсутствие биологического материала [7].

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 10.0» (StatSoft, USA). Данные представлены как медиана (Me) и интерквартильный размах (25;75%). Для сравнения двух независимых групп применяли критерий U Манна–Уитни, для выявления взаимосвязей – корреляционный анализ по Спирмену ( $r_s$ ). Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Выявлено увеличение способности нейтрофилов крови пациентов с ХБП к образованию внеклеточных сетей. Так, значение NETсп у пациентов составило в 30-минутных культурах 6,0% (3,0;10,0), в 150-минутных культурах – 7% (4,0;12,0), что значительно превышало показатели контрольной группы (3,0% (2,05;5,05) и 4,0% (3,0;6,5) соответственно,  $p=0,007$ ,  $p=0,009$ ). В то же время интенсивность нетоза при стимуляции лейкоцитов (NETст) у пациентов не отличалась от значений здоровых лиц. Известно, что оценка нетоза в культурах лейкоцитов различных сроков инкубации позволяет охарактеризовать НАДФ-зависимое (суицидальный нетоз) и независимое (витальный нетоз) образование нейтрофильных ловушек (инкубация 150 минут и 30 минут соответственно) [8,9]. Полученные результаты указывают, что у пациентов с ХБП активируются оба механизма образования сетей. Выявленная нами активация процесса NET только в спонтанном тесте может быть следствием высокой *in vivo* антигенной нагрузки на нейтрофилы, в результате чего примированные нейтрофилы не способны отвечать на стимуляцию *in vitro*.

Показатели NET при различных условиях культивирования были тесно взаимосвязаны между собой. Обнаружена сильная корреляция  $NET_{30} \leftrightarrow NET_{150}$  ( $r_s=0,90$ ,  $p<0,001$  в спонтанном тесте;  $r_s=0,81$ ;  $p<0,001$  – в стимулированном;  $NET_{сп} \leftrightarrow NET_{ст}$  ( $r_s=0,96$ ;  $p<0,001$  при инкубации 30 минут;  $r_s=0,83$ ;  $p<0,001$  – в 150-минутных культурах). Интересно отметить, что у здоровых лиц ассоциации наблюдались только между  $NET_{сп} \leftrightarrow NET_{ст}$  и были менее выражены ( $r_s=0,58$ ;  $p<0,001$  при инкубации культур в течение 30 минут;  $r_s=0,52$ ;  $p<0,001$  при 150-минутной инкубации). Показатели  $NET_{30} \leftrightarrow NET_{150}$  статистически значимых взаимосвязей не имели.

Способность нейтрофилов пациентов к выработке активных форм кислорода была повышена как в спонтанном тесте 11,5 (8,0;14,0)  $p=0,002$ , так и в стимулированном 53,0 (44,0;56,0)  $p=0,02$  в сравнении с группой контроля 6,0 (4,0;10,0) и 43,0 (42,0; 52,0) соответственно. Поглощительная активность Нф у обследованных пациентов не изменялась

Взаимосвязь между различными проявлениями функциональной активности нейтрофилов у пациентов была не значимой, тогда как у здоровых лиц обнаруживалась ассоциация  $NET_{ст} \leftrightarrow НСТ_{сп}$  ( $r_s=-0,57$ ;  $p<0,001$ ) и  $NET_{ст} \leftrightarrow НСТ_{ст}$  ( $r_s=-0,51$ ;  $p=0,002$ ).

По параметрам ЛЗХЛ обнаружено снижение антирадикального действия плазмы пациентов по сравнению со здоровыми лицами. Так, степень угнетения максимальной вспышки ХЛ ( $I_{max},\%$ ) была ниже в 2,8 раза и составила 22,65% (11,6;44,9) ( $p<0,001$ ) в сравнении с контрольной группой 63,6 (55,8;61,5). Значения  $S,\%$  составили 20,9% (10,00;30,9), что в 2,9 раза ниже, чем аналогичный показатель плазмы доноров 60,0 (54,8;60,8) ( $p<0,001$ ). Данные результаты свидетельствуют о недостаточности антиоксидантной активности плазмы пациентов и одновременном накоплении прооксидантов [7], что является отражением эндогенной интоксикации, характерной для больных ХБП 5 стадии. Изменение параметров  $I_{max},\%$  и  $S,\%$  было взаимосвязанным ( $r_s=0,57$ ;  $p<0,001$ ), в отличие от группы здоровых лиц, где данной ассоциации не выявлено.

Статистически значимых взаимосвязей между показателями ЛЗХЛ и функциональными свойствами нейтрофилов обнаружено не было.

## Выводы

1. У пациентов с хронической болезнью почек 5-й стадии выявлена более высокая ( $p=0,007-0,009$ ), по сравнению со здоровыми лицами, исходная способность нейтрофилов к образованию внеклеточных сетей (спонтанный нетоз). Значимых ассоциаций между показателями активности нетоза и другими проявлениями функциональных свойств нейтрофилов не обнаружено.
2. В плазме пациентов с ХБП имеется выраженный сдвиг про/антиоксидантного равновесия с развитием окислительного стресса ( $I_{max},\%=22,65\%$  (11,6;44,9) ( $p<0,001$ );  $S,\%=20,9\%$  (10,00; 30,9) ( $p<0,001$ ) относительно контрольной группы). изменения показателей  $I_{max},\%$

И 5,% взаимосвязаны между собой ( $r_s=0,5$ ;  $p<0,001$ ) только у пациентов, но не у здоровых лиц. значимых корреляций между параметрами функционального статуса нейтрофилов и состоянием про/антиоксидантного баланса не установлено.

### **Литература**

1. Сокуренок, С.И. Иммунологические нарушения у пациентов с хронической болезнью почек. Перспективы иммунозаместительной терапии / С.И. Сокуренок, А.Н. Федосеев, Т.В. Борисова // Клиническая практика. – 2014. – №3(10). – С.83–88.
  2. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – P. 1532–1535.
  3. Rondina, M. T. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases / M. T. Rondina, A. S. Weyrich, G. A. Zimmerman // *Circulation Research*. – 2013. – P. 1506–1519.
  4. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек / Ф.А., Тугушева [и др.] // *Нефрология*. – 2007. – Том 11, №3. – С.29–47.
  5. Новикова, И.А. Комплексная лабораторная оценка иммунного статуса / И.А. Новикова, Е.С. Афанасьева. – Витебск: Издательство ВГМУ, 2003. – 40с.
  6. Гусакова, Н.В., Образование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови / Н.В. Гусакова, И.А. Новикова // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2011; 3 (29) – С. 27–31.
  7. Состояние про/антиоксидантной системы крови у реципиентов почечного аллотрансплантата / Т.С. Петренко [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2017. – Том 6, №2. – С.224–231.
  8. Masuda, S. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers / Sakiko Masuda, Daigo Nakazawa, HarukiShida, Arina Miyoshi, Yoshihiro Kusunoki, UtanoTomaru, Akihiro Ishizu // *Clinica Chimica Acta*. – 2016. – Vol. 459. – P. 89–93.
  9. Camicia, G. Neutrophil extracellular traps in sepsis / G. Camicia, R. Pozner, G. de Larranaga // *Shock*. – 2014. – Vol. 42, № 4. – P. 286–294.
-