

УДК 616.61-008.853.4

Мелеш Т.Н.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

Апоптоз и нетоз нейтрофилов у пациентов с хронической болезнью почек

(Научный руководитель-д.м.н., профессор Новикова И.А.)

Введение. Нейтрофилы (Нф) являются одной из ключевых клеток врожденного иммунитета. Они участвуют в реализации иммунного ответа и контроле за течением воспалительных процессов посредством комплекса сложных взаимосвязанных функций - миграции, адгезии, поглощения и разрушения микробов, выработки активных форм кислорода и азота, продукции ряда цитокинов. Это короткоживущие клетки, однако, при выполнении суицидальной

программы обеспечивают выраженный бактерицидный и иммунорегуляторный эффект [2]. Известны три основных формы гибели нейтрофилов: некроз, апоптоз и нетоз, согласование которых между собой может значительно модулировать активность воспалительных процессов и прогноз течения различных заболеваний [3]. Пациенты с хронической болезнью почек являются уникальной клинической моделью для изучения функциональных свойств нейтрофилов в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и иммуносупрессии. Рядом исследователей было продемонстрировано, что уремические токсины влияют на функцию нейтрофилов, повышая продукцию активных форм кислорода [7] и увеличивая апоптотическую способность Нф [3].

Цель исследования: изучить активность апоптоза и нетоза лейкоцитов крови у пациентов с хронической болезнью почек в терминальной стадии.

Материалы и методы. Обследовано 25 пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5 «Д» стадии (классификация K/DOQI, 2006). Среди пациентов было 8 женщин и 17 мужчин, в возрасте от 22 до 60 лет.

Контрольную группу составили 28 практически здоровых лиц сопоставимых по возрасту и полу.

Материалом для исследования служили лейкоциты периферической венозной крови. Лейкоциты получали путем отстаивания гепаринизированной (10 Ед/мл) крови в течение 45 минут при 37 °С. Интенсивность процессов апоптоза оценивали после инкубации клеточной взвеси в течение 150 минут при 37 °С в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4) без стимулятора (спонтанный уровень, Асп) и в присутствии инактивированным нагреванием *S.aureus* (стимулированный уровень, Аст) по методике [А. Gorman, 1996]. После инкубации клеточную суспензию наносили на предметное стекло и, не высушивая, окрашивали смесью акридинового оранжевого («Sigma», США) в концентрации 100 мкг/мл с этидиумом бромидом («Sigma», США) в концентрации 100 мкг/мл в соотношении 1:1. Смесью покрывали покровным стеклом и выдерживали при комнатной температуре в течение 1-2 минуты. Изучали препараты с помощью люминесцентного микроскопа AxioStarplus HBO 50/AC («ZEISS», Германия; Л возбуждения 490 нм; Л эмиссии 520 нм; увеличение x1000). Определяли долю апоптотических клеток, подсчитывая не менее 200 нейтрофилов. Ядра живых НФ имели рыхлую, неоднородную структуру и бледно-зеленую флуоресценцию. Апоптотические НФ представляли собой клетки с конденсированным хроматином в виде ярких, плотных, однородно окрашенных сфер или полумесяцев, имеющих зелёное и/или оранжевое свечение, без поврежденной мембраны Нф.

Дополнительно нами была проведена оценка способности нейтрофилов к образованию внеклеточных сетей (нетоз). Формирование NETs учитывали по методике И.И. Долгушина в нашей модификации [1] 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.

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 $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Выявлено, что в общей группе пациентов с ХБП интенсивность апоптоза не отличалась от значений здоровых лиц, как в спонтанном тесте (9,0% (5,0; 12,0) vs 7,0% (5,0; 10,0)), так и в стимулированном (17,0% (10,0; 26,0) vs 18,0% (12,0; 22,0))

соответственно. NET-образующая способность лейкоцитов у обследованных пациентов была повышена по сравнению с контролем и составила 4,0% (2,0;6,0) vs 1,0% (1,0;2,0) в спонтанном тесте и 7,0% (5,0;9,0) vs 4,0% (3,0;6,0) - в стимулированном ($p < 0,001$). Однако такие изменения отмечались только в культурах лейкоцитов, инкубированных в течение 30 минут, но не 150 минут. Известно, что оценка нетоза при различной длительности культивирования клеток позволяет охарактеризовать NADPH-зависимое и NADPH-независимое образование NETs (инкубация 150 минут и 30 минут соответственно) [5]. Полученные результаты дают основание предполагать, что у пациентов с ХБП активируется NADPH-независимая форма образования сетей. Значимых корреляций между показателями нетоза и апоптоза нами не установлено.

При индивидуальном анализе значений апоптоза у пациентов выявлена значительная вариабельность параметров: от 1% до 26% в спонтанном тесте и от 2% до 40% - в стимулированном. Наиболее низкие значения (Асп - 1,0% (1,0;3,0), Аст - 5,0% (2,0;7,0)) наблюдались у 3-х пациентов. При этом активность NET существенно не изменялась. У 7 пациентов с высокими значениями апоптоза (Асп -10,0% (7,0; 12,0), Аст - 26,0% (18,0;28,0)) отмечалась достоверная взаимосвязь показателей нетоза в спонтанном и стимулированном вариантах с апоптотической активностью клеток ($r_s = 0,89$; $p = 0,01$; $\alpha = 0,85$; $p = 0,02$ соответственно).

Выводы

1. Нейтрофилы крови пациентов с хронической болезнью почек в терминальной стадии обладают повышенной способностью к нетозу по сравнению со здоровыми лицами, тогда как изменения апоптотической активности вариабельны.
2. У пациентов с повышенными показателями апоптоза обнаружена взаимосвязь между показателями нетоза и апоптоза ($r_s = 0,89$; $p = 0,01$), NETст \leftrightarrow Аст ($r_s = 0,85$; $p = 0,02$).

Литература

1. Гусакова Н.В. Новикова И.А. Образование экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами периферической крови / Н.В. Гусакова, И.А. Новикова // Проблемы здоровья и экологии. -2011. -Т.29, №3,-С. 27-31.
2. Роль нейтрофильных гранулоцитов в иммуновоспалительном процессе / А.В.Москалёв [и др.] // Вестник Рос. воен-мед академии. - 2016. - Т.56, №4. - С.191 -195
3. Gendrogló M, Jaber B.L. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia // The J. Am. Soc. Nephrol. - 1999. - №10. - P.93-100.
4. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / Brinkmann V. [et al.] // Science. - 2004. - Vol. 303. - P. 1532-1535.
5. Neutrophils in the innate immune response / Kobayashi S.D. [et al.] // Arch. Immunol. Ther. 2005. - №53. - P. 505-17.
6. Maureen R.-D., Averill-Bates D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species / R.-D.Maureen, D. A. Averill-Bates // Biochimica et Biophysica Acta. - 2016. - Vol.12, № 1863.-P.2977-2992.