

СЕКЦИЯ 11
«КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»

УДК 616.155.34-091.818:616.61-089.819.843

НЕТОЗ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Гайдаренко Д. С., Мелеш Т. Н.

Научный руководитель: д.м.н., профессор И. А. Новикова

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Известно, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) в ответ на микробные и немикробные стимулы активно формируют во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов — нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps, NETs, нетоз), способны задерживать и убивать микроорганизмы [1]. Клеточная смерть, возникающая в процессе формирования NETs — важнейший механизм врожденного иммунного ответа, значительно отличающийся от апоптоза и некроза по морфологическим и молекулярным критериям [2]. Факторы и механизмы регуляции нетотической активности нейтрофилов пока до конца не исследованы. Реципиенты почечного аллотрансплантата являются уникальной клинической моделью для изучения NET-образующей способности нейтрофилов в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и индуцированной иммуносупрессии.

Цель

Изучить NET-образующую способность нейтрофилов крови у реципиентов почечного аллотрансплантата.

Материал и методы исследования

Обследовано 17 реципиентов почечного аллотрансплантата (3 женщины, 14 мужчин в возрасте от 22 до 65 года) на 10 день после проведенной трансплантации почки. Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу.

Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные из гепаринизированной венозной крови (10 ЕД/мл) путем отстаивания в термостате при 37 °С в течение 45 минут. Количество нейтрофилов в суспензии доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4). Формирование NETs учитывали по методике И. И. Долгушина в нашей модификации [3] после инкубации лейкоцитов в течение 30 и 150 минут при 37 °С в фосфатно-солевом буфере без стимулятора (спонтанный тест, NETs30сп, NETs150сп) и в присутствии инактивированных нагреванием музейного штамма *S. aureus* ATCC 25923 (стимулированный тест, NETs30 ст, NETs150 ст). Клеточную суспензию наносили на предметное стекло, окрашивали по Романовскому — Гимзе с последующей микроскопией под иммерсионным увеличением. В качестве NETs расценивали тонкие свободнолежащие нити сине-фиолетового цвета. Подсчитывали количество NETs 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 % — нижний квартиль; 75 % — верхний квартиль). Для сравнения двух независимых групп применяли критерий U Манна — Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Наличие связи между изучаемыми показателями оценивали с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена (r_s).

Результаты исследования и их обсуждения

У обследованных пациентов регистрировалось повышение способности нейтрофилов крови к образованию внеклеточных сетей. Так, значения нетоза в культурах лейкоцитов, инкубированных в течение 30 минут, составили 5 % (3,5; 9) в спонтанном тесте и 9 % (8; 12) — в стимулированном, тогда как в контрольной группе 1 % (1; 2) и 4 % (3; 6) соответственно (различия значимы при $p < 0,001$). Значения NETs при инкубации 150 минут не отличались от значений контрольной группы и составили 5,5 % (4; 9) в спонтанном тесте и 11 % (9; 23) — в стимулированном. Выявленный нами факт увеличения активности NETs только в 30-минутных культурах, с учетом литературных данных, дает нам основание предполагать, что у пациентов происходит активация только NADPH-независимых форм нетоза [4].

Общее количество лейкоцитов крови у обследованных пациентов варьировало в диапазоне от $4,6 \times 10^9/\text{л}$ до $13,2 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофилов — от 36 до 81 %. Интересно отметить, что у пациентов с нормальным содержанием лейкоцитов (от $4,6 \times 10^9/\text{л}$ – $9,3 \times 10^9/\text{л}$) NETs при инкубации клеток в течение 150 минут в стимулированном тесте были выше, чем значения контрольных лиц и составили 20,5 % (10; 25) vs 8 % (7; 12), при $p = 0,04$. Максимальное количество NETs обнаруживалось у больных с процентным содержанием нейтрофилов в крови более 75 %. При относительной нейтропении нетоз не отличался по количественным значениям от средних значений показателей в группе обследованных пациентов, но отмечалось отсутствие различий между NADPH-независимой и NADPH-зависимой нетотической активностью. Дополнительно нами выявлена обратная взаимосвязь между количеством лейкоцитов и способностью нейтрофилов образовывать экстрацеллюлярные сети при инкубации клеток в течение 30 минут в стимулированном варианте теста ($r_s = -0,50$; $p = 0,002$).

Выводы

1. У реципиентов почечного аллотрансплантата на 10-е сутки послеоперационного периода обнаружена активация NADPH-независимого нетоза лейкоцитов крови по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,001$).
2. Выявлена обратная взаимосвязь между количеством лейкоцитов и способностью нейтрофилов образовывать экстрацеллюлярные сети при инкубации клеток в течение 30 минут в стимулированном варианте теста ($r_s = -0,50$; $p = 0,002$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // Science. — 2004. — № 303. — P. 1532–1535.
2. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм: Ч. 1. / И. В. Нестерова [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2017. — Т. 7, № 3. — С. 219–230.
3. 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.
4. Yipp, B. G. NETosis: how vital is it? / B. G. Yipp, P. Kubes // Blood. — 2013. — Vol. 16, № 122. — P. 2784–2794.