

УДК 616.155.34:616.61

Новикова И.А.<sup>1</sup>, Мелеш Т.Н.<sup>1</sup>, Зыблев С.Л.<sup>1</sup>, Свистунова Е.А.<sup>2</sup><sup>1</sup> Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, БеларусьNovikova I.<sup>1</sup>, Melesh T.<sup>1</sup>, Zyblev S.<sup>1</sup>, Svistunova E.<sup>2</sup><sup>1</sup> Gomel State Medical University, Gomel, Belarus<sup>2</sup> Republican Scientific Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

## Функциональный статус нейтрофилов у реципиентов почечного аллотрансплантата

### Functional Status of Neutrophils in Recipients of Renal Allograft

#### Резюме

**Введение.** Реципиенты почечного аллотрансплантата являются уникальной клинической моделью для изучения функциональных свойств нейтрофилов в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и иммуносупрессии. Определенное влияние на количество и функциональные свойства нейтрофилов оказывают иммуносупрессивные препараты: наблюдается активация апоптоза, сокращается продолжительность жизни нейтрофилов, что в некоторых случаях может привести к нейтропении. Несмотря на высокую патогенетическую и лабораторно-диагностическую значимость констатируемых изменений в состоянии нейтрофилов, к настоящему времени не исследованы на основе новых знаний и с учетом современных технологических достижений особенности функциональных свойств нейтрофилов при индуцированной иммуносупрессии и не определена их возможная роль в развитии осложненных посттрансплантационного периода.

**Цель исследования.** Изучить изменения функциональных свойств нейтрофилов крови у реципиентов почечного аллотрансплантата.

**Материалы и методы.** У 31 реципиента почечного аллотрансплантата (9 мужчин и 22 женщины в возрасте  $49,5 \pm 14$  лет) изучена способность нейтрофилов крови к образованию активных форм кислорода (АФК), нетозу и фагоцитозу. Пациенты наблюдались в течение 30 суток после трансплантации. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых с опытной группой по возрастному и половому составу. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 (StatSoft, USA).

**Результаты и обсуждение.** Выявлено, что у пациентов с хронической болезнью почек 5Д стадии и у реципиентов почечного аллотрансплантата в период наблюдения (30 суток) количество NET-образующих нейтрофилов в крови (установленных по результатам постановки АФК-независимых тестов) повышено (4,0% ( $p=0,006$  – спонтанный тест) и 6,0% ( $p=0,04$  – стимулированный тест)) относительно здоровых лиц (1% и 4% соответственно). Максимальная степень увеличения показателей нетоза отмечается на 9–10-е сутки от момента операции ( $p<0,01$ ). Обнаружена обратная взаимосвязь между NET-образующей способностью и АФК-продуцирующей активностью нейтрофилов ( $r_s=-0,84$ ;  $p=0,03$ ).

**Заключение.** У реципиентов почечного аллотрансплантата в ранний посттрансплантационный период повышена способность нейтрофилов крови к образованию внеклеточных сетей (NETs).

**Ключевые слова:** нейтрофильные внеклеточные ловушки, аллотрансплантация почки.

## Abstract

---

**Introduction.** Recipients of renal allograft are a great clinical model for studying the functional properties of neutrophils in conditions of severe endogenous intoxication, inflammation and immunosuppression. Immunosuppressive drugs have a certain effect on the number and functional properties of neutrophils: activation of apoptosis, reduction of life span of NP, which in some cases can lead to neutropenia. The features of the functions of neutrophils in the induced immunosuppression in the aspect of new knowledge and their possible role in the development of complications of the post-transplantation period have not been previously studied.

**Purpose.** To study the changes in the functionality of blood neutrophils in renal allograft recipients.

**Materials and methods.** The ability of blood neutrophils to form reactive oxygen species (ROS), netosis and phagocytosis was studied in 31 recipients of renal allograft. Patients were observed for 30 days after transplantation. The control group consisted of 30 healthy individuals comparable with the experimental group in age and sex. Statistical analysis of the results was performed using the computer program Statistica 10.0 (StatSoft, USA).

**Results and discussion.** It was revealed that in patients with chronic kidney disease of the 5D stage and in recipients of renal allograft, during the observation period (30 days), the number of NET-forming neutrophils in the blood increased by 4,0% ( $p=0,006$  – spontaneous test) and 6,0% ( $p=0,04$  – stimulated test) in comparison with healthy individuals. The maximum degree of increase in non-toxic indicators is noted on the days 9–10 from the moment of operation ( $p<0,01$ ). The inverse relationship was found between the NET-forming ability and the ROS-producing activity of neutrophils ( $r_s=-0,84$ ;  $p=0,03$ ).

**Conclusion.** In the recipients of renal allograft, in the early post-transplantation period, the ability of blood neutrophils to form extracellular networks (NETs) is increased.

**Keywords:** neutrophilic extracellular traps, kidney allotransplantation.

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные лейкоциты (нейтрофилы, Нф) являются, как известно, одним из основных компонентов врожденного иммунитета и играют ключевую роль в формировании и регуляции воспалительных процессов в организме – как непосредственно уничтожая микроорганизмы, так и путем выработки различных провоспалительных факторов [1]. Выполнение этих функций обеспечивается за счет различных проявлений реактивности Нф: миграции, адгезии, поглощения и киллинга микроорганизмов, секреторной дегрануляции, выработки кислородных радикалов, оксида азота и др. Описана способность активированных Нф образовывать внеклеточные сетеподобные структуры (neutrophil extracellular traps – NETs, нетоз), состоящие из ядерной ДНК, гистонов, белков и ферментов гранул, которые способны к захвату и киллингу различных патогенов и дополняют другие проявления бактерицидного потенциала нейтрофилов [2]. Клеточные механизмы образования NETs интенсивно изучаются. Известно, что стимуляция нейтрофилов *in vitro*, например, форбол-миристан-ацетатом повышает способность к нетозу, но эффект реализуется не ранее чем через 120 минут инкубации клеток и сопровождается активацией NADPH-оксидазы [3]. Такой тип нетоза называют «суицидальным», так как при этом происходит разрушение нейтрофилов. В то же время имеются

убедительные доказательства возможности быстрой индукции нетоза (в течение 5–60 минут) без активации NADPH-оксидазы и гибели Нф, например, под действием *S. aureus*, грибов (так называемый витальный нетоз) [4, 5]. Факторы и механизмы регуляции нетотической активности нейтрофилов пока до конца не исследованы.

Реципиенты почечного аллотрансплантата 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 (АФК) [6] и увеличивая апоптотическую способность Нф [7]. Определенное влияние на количество и функциональные свойства нейтрофилов оказывают иммуносупрессивные препараты: наблюдается активация апоптоза, сокращается продолжительность жизни Нф, что в некоторых случаях может привести к нейтропении [8, 9]. Особенности функциональных свойств нейтрофилов при индуцированной иммуносупрессии в аспекте новых знаний и их возможной роли в развитии осложнений посттрансплантационного периода ранее не исследовались.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить изменения функциональных свойств нейтрофилов крови у реципиентов почечного аллотрансплантата.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследован и прооперирован в отделении трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ») 31 реципиент почечного аллотрансплантата (9 женщин, 22 мужчины, средний возраст которых составил  $49,5 \pm 14$  лет) в связи с хронической болезнью почек (ХБП) стадии 5Д (классификация K/DOQI, 2006). Диагностика и лечение проводились согласно клиническому протоколу трансплантации почки (приказ МЗ РБ № 1540 от 05.01.2012). Лабораторное исследование проводилось до операции, на 1–2-е сутки после операции, а затем каждые 7–10-е сутки. Пациенты наблюдались в течение 30 суток после трансплантации. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых с опытной группой по возрастному и половому составу.

Иммунологическое обследование включало оценку поглотительной активности нейтрофилов, их способности к образованию АФК и формированию внеклеточных сетей (NETs). В качестве стимулятора использовали убитый нагреванием музейный штамм *S. aureus* ATCC 25923 (концентрация микробных тел  $10^8$  КОЕ/мл).

Материалом для исследования служили лейкоциты, полученные из гепаринизированной венозной крови (10 ЕД/мл) путем отстаивания в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 45 минут. Количество нейтрофилов в суспензии доводили до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл путем разведения необходимым количеством фосфатно-солевого буфера ( $\text{pH}=7,4$ ).

Поглотительную активность определяли в реакции фагоцитоза *S. aureus* с подсчетом в мазках процента фагоцитирующих нейтрофилов

(фагоцитарный индекс – ФИ) и среднего числа микробов в клетке (фагоцитарное число – ФЧ). Кислород-продуцирующую активность Нф оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в спонтанном (НСТсп) и стимулированном (НСТст) вариантах с микроскопической оценкой препаратов, окрашенных нейтральным красным [10]. Подсчитывали количество нейтрофилов с гранулами диформаза на 200 сосчитанных гранулоцитов, результат выражали в процентах.

Формирование NETs учитывали по методике И.И. Долгушина в нашей модификации [11] после инкубации лейкоцитов в течение 30 и 150 минут при 37 °С в фосфатно-солевом буфере без стимулятора (спонтанный уровень, NETs<sub>30</sub>сп, NETs<sub>150</sub>сп) и в присутствии инактивированных нагреванием *S. aureus* (стимулированный уровень, NETs<sub>30</sub>ст, NETs<sub>150</sub>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, для парного сравнения зависимых групп использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ . Наличие связи между изучаемыми показателями оценивали с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена ( $r_s$ ).

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в дооперационном периоде у пациентов с ХБП 5Д стадии среди показателей функционального статуса нейтрофилов были изменены, по сравнению со здоровыми лицами, только нетотические свойства лейкоцитов. Так, в целом по группе значения NETs<sub>30</sub>сп составили 4,0% (2,0; 6,0) у пациентов, тогда как у здоровых лиц – 1,0% (1,0; 3,0) ( $p=0,006$ ). Показатели стимулированного теста у пациентов – 6,0% (4,0; 9,0) ( $p=0,04$ ); у здоровых лиц – 4,0% (3,0; 6,0) (рис. 1). Учитывая, что все обследованные пациенты находились в терминальной стадии заболевания, данный факт может указывать, что в условиях эндогенной интоксикации увеличивается NET-образующая способность нейтрофилов крови. Следует подчеркнуть, что количество нетотических клеток оказалось повышенным только в 30-минутных, но не 150-минутных культурах лейкоцитов пациентов.

Как известно, формирование NETs может происходить как с участием фермента NADPH-оксидазы, так и без него [3, 5]. В первом случае для воспроизведения в условиях *in vitro* требуется инкубация клеточных культур не менее 120 минут. Это время необходимо для активации NADPH-оксидазы, выделения из азурофильных гранул и перемещения к ядру клетки нейтрофильной эластазы и миелопероксидазы, которые в конечном итоге приводят к дезинтеграции оболочки ядра, выходу хроматина и лизису нейтрофилов с образованием сетеподобной структуры [3]. Второй путь является NADPH-независимым и реализуется в течение

5–60 минут. При этом происходит перенос ДНК от ядерной оболочки через цитоплазму в составе везикул, содержащих деконденсированный хроматин и гранулярные гистоновые белки. Формирование NETs происходит путем слияния везикулы с мембраной клетки [5, 12]. Выявленный нами факт увеличения активности NETs только в 30-минутных культурах с учетом представленных данных дает нам основание предполагать, что у пациентов с ХБП в терминальной стадии происходит активация только NADPH-независимых форм нетоза.

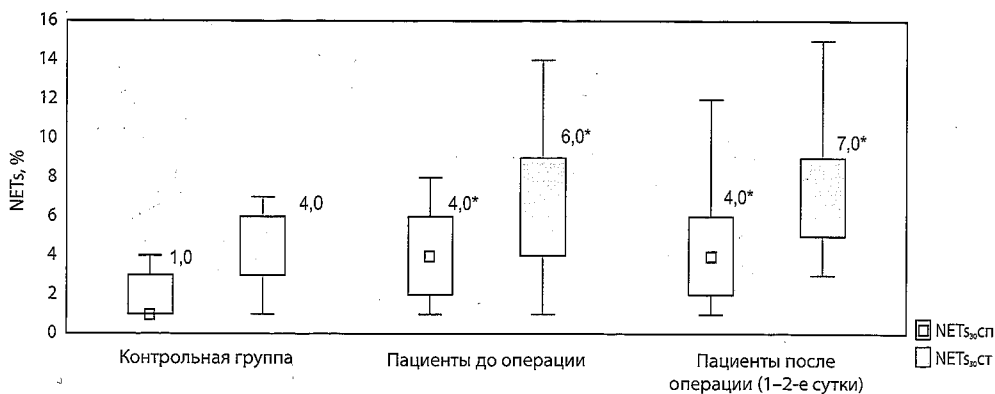
На 1–2-е сутки после аллотрансплантации почки способность лейкоцитов крови к NADPH-независимому нетозу существенно не изменилась (рис. 1). Значения NETs<sub>30'</sub>, как видно из рисунка, оставались повышенными как в спонтанном ( $p=0,008$ ), так и в стимулированном ( $p=0,002$ ) тестах.

Это дает основание предполагать, что само оперативное вмешательство и постоперационный стресс не оказывают существенного влияния на нетотическую активность клеток.

Повышенные значения NETs<sub>30'</sub> сохранялись на протяжении всего периода наблюдения (30 суток). Более того, к 9–10-м суткам от момента операции отмечалось дополнительное повышение количества нетотических клеток в крови реципиентов ( $p=0,03$  по сравнению с аналогичными показателями на 1–2-е сутки постоперационного периода). В этот же период наблюдалась активация NADPH-зависимого нетоза (NETs<sub>150'</sub>), значения которого в стимулированном варианте теста составили 17,5% (9,5; 25,5), тогда как в контрольной группе 8,0% (7,0; 12,5) ( $p<0,001$ ). К 30-м суткам послеоперационного периода значения NETs<sub>150'</sub> снизились до уровня значений здоровых лиц.

По параметрам АФК-продуцирующей (НСТсп и НСТст) и поглощательной (ФИ, ФЧ) активности нейтрофилов значимых колебаний в течение послеоперационного периода не отмечалось.

У 6 реципиентов почечного аллотрансплантата проанализирована индивидуальная динамика NADPH-независимого нетоза в различные



**Рис. 1. Параметры NADPH-независимого нетоза у реципиентов почечного аллотрансплантата**

Примечание: \* различия значимы в сравнении с контрольной группой ( $p<0,05$ ).

периоды наблюдения. Исходные значения NETs<sub>30</sub> варьировали от 2 до 9% в спонтанном тесте и от 5 до 12% в стимулированном. Отмечены выраженные различия вектора изменений показателей NETs у реципиентов. Они могли оставаться стабильно повышенными весь период наблюдения (например, у пациента 4) либо иметь большой размах колебаний (пациенты 1, 2, 3, 5). К 30-м суткам наблюдения показатели спонтанного нетоза у обследованных пациентов, как правило, возвращались к исходным значениям (до операции). Параметры NETs в стимулированном варианте теста изменялись, как правило, аналогично с результатами спонтанного теста, однако не у всех пациентов. Например, у пациента 6 значения спонтанного нетоза к 10-м суткам снижались, а стимулированного NETs, напротив, достигали максимальных значений (14%). Следует также отметить, что показатели нетоза в стимулированном тесте характеризовались значительно меньшей индивидуальной вариабельностью на этапах обследования, чем в спонтанном тесте к 9–10-м суткам наблюдения.

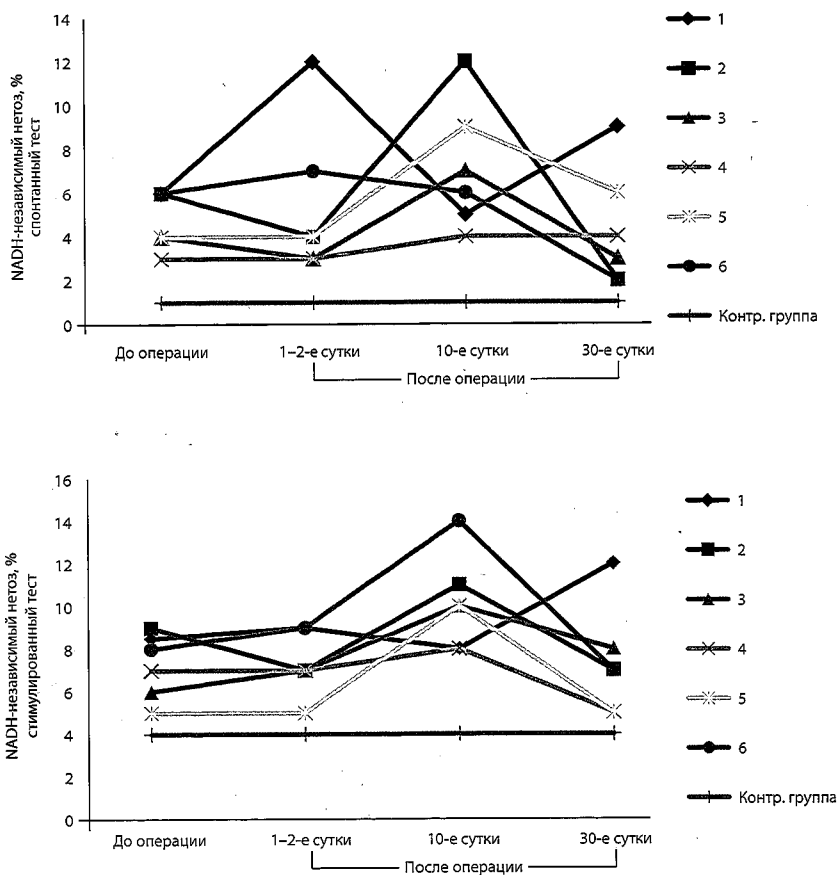


Рис. 2. Характер изменений показателей NADPH-независимого нетоза у 6 реципиентов в динамике посттрансплантационного периода

Проведенные исследования продемонстрировали, что, несмотря на значительные индивидуальные колебания показателей нетоза на этапах посттрансплантационного периода, на 9–10-е сутки после операции отмечается выраженный всплеск нетотической активности клеток, сменяющийся к 30-м суткам наблюдения возвратом показателей к исходным значениям. Кроме того, следует отметить, что изменения NETs в спонтанном и стимулированном вариантах теста могут происходить разнонаправлено. Это свидетельствует о необходимости одновременной постановки обоих тестов для повышения информативности обследования.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных проблеме нетоза, до сих пор остаются неясными его место и роль в общем комплексе реакций, которые развивает нейтрофил при патологических процессах. Предполагается существование отдельных субпопуляций нейтрофилов, одна из которых осуществляет функции живой клетки (например, фагоцитоз), а другая ответственна за реализацию суицидальной программы (нетоз, фагоцитоз) [5]. Поэтому мы оценили характер взаимосвязей между параметрами NADPH-независимого нетоза и другими проявлениями реактивности нейтрофилов (поглощение, продукция кислородных радикалов, NADPH-зависимый нетоз). При этом установлено, что у пациентов с ХБП 5Д стадии в предоперационном периоде статистически значимые корреляции между этими показателями отсутствовали, тогда как в контрольной группе наблюдалась взаимосвязь показателей NETs<sub>30</sub>ст и НСТст ( $r_s = -0,64$ ;  $p = 0,006$ ). У реципиентов начиная с десятых суток послеоперационного периода обнаружена взаимосвязь между NETs<sub>30</sub>ст и НСТсп ( $r_s = -0,84$ ;  $p = 0,03$ ).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что у реципиентов почечного аллотрансплантата имеет место повышение показателей NADPH-независимого нетоза, которое сохраняется по меньшей мере до 30-х суток послеоперационного периода. Связан ли данный факт с активацией процессов образования экстрацеллюлярных сетей или нарушением механизмов их элиминации – пока остается неясным. Не исключено влияние растворимых факторов, присутствующих в уремической плазме, способность которых влиять на функциональные свойства нейтрофилов продемонстрирована в ряде исследований [6, 7]. Дальнейшее изучение NET-образующей и других функций Нф у реципиентов аллотрансплантационной почки может представлять интерес как в аспекте изучения механизмов взаимодействия организма с трансплантатом, так и с точки зрения прогноза течения и мониторинга терапии в посттрансплантационном периоде.

## ■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хронической болезнью почек 5Д стадии и реципиентов почечного аллотрансплантата обнаружена активация NADPH-независимого нетоза лейкоцитов крови по сравнению со здоровыми лицами ( $p = 0,001-0,04$ ), которая сохраняется по меньшей мере до 30-х суток послеоперационного периода. Максимальное количество нетотических клеток выявляется у реципиентов на 9–10-е сутки после трансплантации почки ( $p < 0,01$ ).

2. Не выявлено значимых взаимосвязей между различными проявлениями функциональной активности нейтрофилов (фагоцитоз, метаболическая активность, нетоз) у пациентов с ХБП в терминальной стадии. После 10-х суток посттрансплантационного периода у реципиентов устанавливается статистически значимая обратная взаимосвязь между количеством нетотических клеток и АФК-продуцирующей активностью нейтрофилов ( $r_s = -0,84$ ;  $p = 0,03$ ).

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА

1. Moscalev A.V., Rudoi A.S., Apchel A.V., Shangin A.B. (2016) The role of neutrophilic granulocytes in the immune-inflammatory process. *Vestnik Ros. military med academy*, vol. 4 (56), pp. 191–195.
2. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, vol. 303, pp. 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385.
3. Hakkim A., Fuchs T.A., Martinez N.E., Hess S., Prinz H., Zychlinsky W.H. (2011) Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.*, vol. 7 (2), pp. 75–77. doi:10.1038/NCHEMBO.496.
4. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M., Lavigne L.M., Reichner J.S. (2013) An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.*, vol. 190 (8), pp. 4136–4148. doi: 10.4049/jimmunol.1202671.
5. Yipp B.G., Kuberski P. (2013) NETosis: how vital is it? *Blood*, vol. 122 (16), pp. 2784–2794. doi: 10.1182/blood-2013-04-457671.
6. Ward R.A., McLeish K.R. (1995) Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol.*, vol. 5 (9), pp. 1697–1702.
7. Gendoroglo M., Jaber B.L. (1999) Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *The J. Am. Soc. Nephrol.*, no 10, pp. 93–100.
8. Assfalg V., Huser N., Reim D., Kaiser-Moore S., Rossmann-Bloeck T., Weighardt H. (2010) Combined immunosuppressive and antibiotic therapy improves bacterial clearance and survival of polymicrobial septic peritonitis. *Shock*, vol. 33 (2), pp. 155–161. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181ab9014
9. De Rycke A., Dierckx D., Kuypers D.R. (2011) Tacrolimus-Induced Neutropenia in Renal Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.*, vol. 6, pp. 690–694. doi: 10.2215/CJN.07320810.
10. Novikova I.A., Afanasyeva E.U. (2003) *Comprehensive laboratory assessment of immune status*. Belarus: Vitebsk, 40 p.
11. Gusakova N.V., Novikova I.A. (2011) Formation of extracellular networks by peripheral blood neutrophils. *Health and ecology problems*, vol. 29 (3), pp. 27–31.
12. Camicia G., Pozner R., Larranaga G. (2014) Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, vol. 42(4), pp. 286–294. doi: 10.1097/SHK.0000000000000221.

---

Поступила/Received: 28.02.2019

Контакты/Contacts: clinlab@gsmu.by, mel-tanya@yandex.ru