Резюме.

Пациенты с хронической болезнью почек (ХБП) являются уникальной клинической «моделью» для изучения функций иммунокомпетентных клеток в условиях выраженной эндогенной интоксикации, воспаления и иммуносупрессии. Цель работы: комплексная оценка показателей морфофункциональной активности нейтрофилов у пациентов в терминальной стадии хронической почечной недостаточности. Обследованы 49 пациентов с ХБП 5 «Д» (по классификации K/DOQI, 2006) (16 женщин, 23 мужчины в возрасте от 22 до 63 года) и 60 практически здоровых лиц (контроль). Материалом для исследования служил лейкоконцентрат венозной крови. Оценивали функциональные свойства нейтрофилов: формирование внеклеточных сетей (нетоз, NETs) микроскопически с окраской по Романовскому-Гимзе при культивировании клеток в течение 30 и 150 минут; образование активных форм кислорода – АФК (цитохимический метод с нитросиним тетразолием), апоптотическую активность (люминесцентная микроскопия после окраски смесью акридинового оранжевого с этидиумом бромидом), а также поглотительную способность в реакции фагоцитоза. Тесты ставили в спонтанном и стимулированном вариантах, в качестве стимулятора использовали убитый нагреванием музейный штамм S. aureus АТСС 25923. Выявлено повышение параметров нетоза в 30-минутных (но не 150-минутных) культурах клеток как в спонтанном, так и в стимулированном вариантах (р<0,001) и апоптоза (р=0,02). Продукция нейтрофилами активных форм кислорода и их поглотительная активность значимо не изменялась. Параметры нетоза и апоптоза прямо коррелировали между собой (rs=0,34; р=0,03), а также зависели от уровня азотемии (коэффициент корреляции составил для показателей нетоза и уровня мочевины rs=0,41; р=0,01, для апоптоза и мочевины rs= 0,34; р= 0,02). Обнаружена взаимосвязь между уровнем апоптоза и продукцией АФК нейтрофилами (rs= -0,51; р=0,03). Проведенные исследования свидетельствуют, что у пациентов с ХБП в терминальной стадии повышена готовность к выполнению суицидальной программы – апоптозу и нетозу. Учитывая повышение параметров нетоза именно при краткосрочном культивировании лейкоцитов (30 минут), можно предполагать участие в первую очередь NADPH-независимых механизмов. Продемонстрированная нами прямая зависимость параметров нетоза и апоптоза от уровня азотемии позволяет рассматривать в качестве одной из первоочередных причин повышения активности суицидальной программы нейтрофилов накопление в организме пациентов продуктов эндогенной интоксикации, в частности, окисленных протеинов.

Summary.

Patients with chronic kidney disease (CKD) are a unique clinical “model” for studying the functions of immunocompetent cells in the face of severe endogenous intoxication, inflammation and immunosuppression. Objective: a comprehensive assessment of the morphological and functional activity of neutrophils in patients in the terminal stage of chronic renal failure. We examined 49 patients with CKD 5 “D” (according to the classification K / DOQI, 2006) (16 women, 23 men aged 22 to 63 years) and 60 healthy individuals (control). The material for the study was leukoconcentrate of venous blood. The functional properties of neutrophils were evaluated: the formation of extracellular networks (netosis, NETs) microscopically with Romanovsky-Giemsa staining during cell cultivation for 30 and 150 minutes; formation of reactive oxygen species - ROS (cytochemical method with nitro blue tetrazolium), apoptotic activity (luminescence microscopy after staining with a mixture of acridine orange with ethidium bromide), as well as absorption capacity in the reaction of phagocytosis. Tests were performed in spontaneous and stimulated versions; the museum strain S. aureus ATCC 25923 killed by heating was used as a stimulator. An increase in netosis parameters was revealed in 30-minute (but not 150-minute) cell cultures in both spontaneous and stimulated versions (p <0,001) and apoptosis (p = 0,02). Neutrophil production of reactive oxygen species and their absorption activity did not significantly change. The parameters of netosis and apoptosis directly correlated with each other (rs = 0,34; p = 0,03), and also depended on the level of azotemia (the correlation coefficient for the indicators of netosis and urea level was rs = 0,41; p = 0,01, for apoptosis and urea rs = 0,34; p = 0,02). A relationship was found between the level of apoptosis and ROS production by neutrophils (rs = -0,51; p = 0,03). Studies have shown that patients with CKD in the terminal stage have an increased willingness to carry out a suicidal program - apoptosis and netosis. Considering the increase in the parameters of netosis precisely during shorter cultivation of leukocytes (30 minutes), it can be assumed that NADPH-independent mechanisms are primarily involved. The direct dependence of the parameters of netosis and apoptosis on the level of azotemia demonstrated by us allows us to consider the accumulation of endogenous intoxication products, in particular, oxidized proteins, in the patient’s body as one of the primary reasons for increasing the suicidal neutrophil program.