

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Хемилюминесцентная активность тромбоцитов и нейтрофилов у больных  
ишемической болезни сердца в постоперационный период

Научный руководитель \_\_\_\_\_  
подпись, дата  
Выпускник \_\_\_\_\_  
подпись, дата

профессор, д.м.нА.А. Савченко  
Ю.А. Дубынина

Красноярск 2019

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Хемилюминесцентная активность тромбоцитов и нейтрофилов у больных ишемической болезни сердца в постоперационный период» содержит 45 страниц текстового документа, 38 использованных источников.

ТРОМБОЦИТЫ, НЕЙТРОФИЛЫ, ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ.

Целью работы было определение особенностей хемилюминесцентной реакции нейтрофилов и тромбоцитов у больных ишемической болезни сердца относительно контрольной группы практически здоровых людей.

Задачи:

-провести исследования спонтанной и индуцированной ХЛ нейтрофилов в трех группах: контрольная группа, больные ИБС, больные ИБС в постоперационный период.

-провести исследования спонтанной и индуцированной ХЛ тромбоцитов в трех группах: контрольная группа, больные ИБС, больные ИБС в постоперационный период.

- оценка различий ХЛ активности нейтрофилов и тромбоцитов контрольной группы с группами больных ИБС до и после операции.

Актуальность проблемы заключается в огромном распространении заболеваний сердца. Исследуемые клетки, имея огромную роль в патологии ишемической болезни сердца, способны вырабатывать активные формы кислорода (АФК) в интактном и активированном состоянии, что дает нам возможность оценить относительный уровень АФК в клетках и предположить, что это изменение связано с изменением метаболической активности.

Итогом работы является достоверно выявленное повышение ХЛ-активности исследуемых клеток у больных ишемической болезни сердца в

отношение группы относительно- здоровых людей. Данный результат в клетках тромбоцитов связываем с реорганизацией их цитоскелета, так как большое количество АФК генерируется при активации рецептор-опосредованных путей. Высокие показатели ХЛ- активности нейтрофилов непосредственно могут быть связаны с их фагоцитарной функцией, в связи с тем, что для респираторного взрыва необходимо накопление большого количества АФК.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1.1 Атеросклероз.....	6
1.1.2 Биохимические изменения при ишемической болезни сердца.....	7
1.2 Физиология и морфология тромбоцитов.....	8
1.2.1 Участие в свертывании крови.....	9
1.2.2 Источники АФК в тромбоцитах.....	11
1.2.3 Антиоксидантная защита.....	15
1.3 Физиология и морфология нейтрофилов.....	16
1.3.1 Генерация активных форм кислорода нейтрофилами.....	18
1.3.2 Адгезионное взаимодействие нейтрофилов с эндотелием.....	20
1.4 Хемилюминесценция клеток и тканей.....	23
1.4.1 Люминол-зависимая хемилюминесценция клеток.....	24
1.4.2 Люцигенин-зависимая ХЛ клеток.....	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1 Материалы.....	27
2.2 Методы исследования.....	27
2.3 Определение хемилюминисцентной активности нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови.....	28
2.4 Статистические методы исследования.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	41

## ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, по статистике Всемирной организации здравоохранения- основная причина смерти во всем мире. На долю ишемической болезни сердца (ИБС) приходится 7 млн. смертей ежегодно. ИБС- группа заболеваний, обусловленные недостаточным снабжением миокарда кислородом. Основной причиной (более чем в 90% случаев) является образование атеросклеротических бляшек в просвете коронарных артерий[1].

В атеросклеротическом процессе центральную роль играют нейтрофилы, участвующие в воспалительном ответе и тромбоциты, фигурирующие в непосредственном образовании бляшек внутри сосудов и артерий. Ввиду того, что данные клетки организма занимают важнейшее место в патогенезе ИБС, целью моей работы стало изучение особенностей их функционального состояния в динамике заболевания ИБС.

Тромбоциты и нейтрофилы выделяют активные формы кислорода(АФК) как в активированном, так и интактном состоянии, поэтому предполагается, что их продукция служит модулятором активности данных клеток.Для определения интенсивности производства АФК применяют метод хемилюминесценции (ХЛ), основанный на добавлении в обогащенную клетками плазму люминола и люцигенина с последующей регистрацией ХЛ на хемилюминомере.

Целью исследования является установление особенностей спонтанной и индуцированной ХЛнейтрофилов и тромбоцитов больных ИБС,больных ИБСв постоперационный период относительно контрольной группы.

Задачи:

Исследовать спонтанную и индуцированную ХЛ нейтрофилов в трех группах: контрольная группа, больные ИБС, больные ИБС в постоперационный период.

Исследовать спонтанную и индуцированную ХЛ тромбоцитов в трех группах: контрольная группа, больные ИБС, больные ИБС в постоперационный период.

Оценить различия ХЛ активностинейтрофилов и тромбоцитов контрольной группы с группами больных ИБС до и после операции.

Исследование проводилось на базе ФБГУ НИИ медицинских проблем Севера, в лаборатории Клеточно-молекулярной физиологии и патологии.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Этиология и патогенез ишемической болезни сердца

Ишемическая болезнь сердца(ИБС)- патологическое состояние, в основ которого лежит абсолютное или относительное нарушение кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий сердца. ИБС может обусловлена многими заболеваниями, такими как: наследственные, к ним относятся дефекты сосудов;воспалительные, например, васкулиты, инфекционные поражения; обменные. В более чем 95% случаев данное заболевание вызвано атеросклерозом.

ИБС это общее название, в которое входит несколько самостоятельных форм патологий, различных по проявлениям и выраженностью последствий ишемии миокарда: стенокардию, инфаркт миокарда; диффузный (атеросклеротический) и очаговый, или постинфарктный, кардиосклероз (включая аневризму сердца), проявляющийся клинически нарушениями ритма и/или развитием сердечной недостаточности[1].

К основным факторам риска следует отнести нарушение липидного обмена, при котором повышается содержание холестерина в крови, артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение, низкая физическая активность и длительное психоэмоциональное напряжение[1,2].

Снабжение кислородом тем ниже, чем более высокой становится работа сердца и чем уже просвет коронарных артерий. Физические нагрузки и стресс способны вызывать симптомы обострения. Центральное значение в патогенезе коронарной недостаточности имеет нарушение функции тромбоцитов и повышение свертываемости крови, это явление способно ухудшить микроциркуляцию в капиллярах миокарда и приводить к тромбозу артерий, которому способствуют атеросклеротические изменения их стенок, в связи с этим происходит замедление кровотока в местах сужения просвета

артерий. Поражение артерий приводит к увеличению продолжительности болевых приступов и развитию дистрофии миокарда, вплоть до некроза [2].

### 1.1.1 Атеросклероз

Атеросклероз – это патология, в основе которой лежит появление атерогенных бляшек на внутренней поверхности стенки сосудов. Данная патология вызвана нарушением поступления холестерина (ХС), а также его синтеза и выведения. У пациентов характерным является повышение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Данный процесс активируется в нескольких случаях: при избыточном поступлении ХС, углеводов и жиров; генетическая предрасположенность, заключающейся в наследственных дефектах структуры рецепторов ЛПНП или апоВ-100, так же способна вызвать этот процесс; повышенный синтез или секреция апоВ [2,3].

Важную роль в механизмах развития атеросклероза играет модифицирование ЛП (гликозилирование белков, перекисная модификация). При измененной структуре липидов и белков в составе ЛПНП, фагоциты принимают их за чужеродный объект и производят захват, неконтролируемое поглощение ЛПНП превращают их в «пенистые клетки».

Затем эти клетки проникают в субэндотелиальное пространство и формируют липидные пятна или полосы в стенке кровеносных сосудов. Эндотелий способен сохранять свою структуру на этой стадии [3].

При большем увеличении пенистых клеток происходит повреждение эндотелия и запускается процесс активации тромбоцитов. В результате активированные тромбоциты секретируют тромбоксан, стимулирующий их агрегацию, а также начинают продуцировать тромбоцитарный фактор роста, который стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток. Последние мигрируют во внутренний слой артериальной стенки из медиального, таким образом, способствуя росту бляшки. После чего бляшка прорастает



фиброзной тканью, а клетки под ней некротизируются, что приводит к откладыванию ХС в межклеточном пространстве.

На последней стадии, бляшка пропитывается солями кальция и становится очень плотной, в этой области возрастает риск тромбообразования. Перекрытие просвета сосуда приводит к острому нарушению кровообращения в соответствующем участке ткани и развитию инфаркта [4].

### **1.1.2 Биохимические изменения при ишемической болезни сердца**

ИБС сопровождается гипоксией тканей, которая запускает процесс свободнорадикального окисления, перекисного окисления липидов, накопление токсичных продуктов, повреждение регуляторных систем антиокислительной защиты. Повреждение клеток и субклеточных частиц вызывает нарушение функционирования электронтранспортных цепей мембранных комплексов клетки и способствует образованию АФК. Так же активируются процессы свободнорадикального окисления липидов, возникающие при гипоксическом состоянии [4].

Вне зон ишемии наблюдается снижение содержания гликогена и глюкозы, повышение количества молочной кислоты и падение активности ферментов гликолиза, но менее выраженное [5].

### **1.2 Физиология и морфология тромбоцитов**

Тромбоциты - безъядерные клетки, являющиеся форменными элементами крови. Образование тромбоцитов происходит путем фрагментации цитоплазмы мегакариоцитов костного мозга. Объем циркулирующих пластинок в течение 5-10 дней достигает 200-400 тыс/мкл.

Важнейшая роль тромбоцитов заключается в остановке кровотечения при повреждениях, а также в патологическом тромбообразовании [6].

Тромбоциты не содержат ядра, но осуществляют все основные биохимические процессы, такие как: окислительное

фосфорилирование, синтез и обмен белков и липидов. В цитоплазме различают гиаломер и глануромер. Гиаломер- тонкогранулярная субстанция, плотность которой зависит от возраста и функционального состояния тромбоцитов.

Подгрануломером тромбоцитов понимают совокупность гранул, расположенных в цитоплазме. Глануромер содержит: плотные гранулы, альфа гранулы, митохондрии, гликоген, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи и другие. Кроме того, биологически активные вещества, связанные со свертыванием крови содержатся в гранулах: альфа-гранулах (фибриноген, фибронектин, тромбоспондин, фактор Виллебранда и другие) и плотных гранулах (АДФ, АТФ, кальций, магний, пироген, гистамин, серотонин).

Гликокаликс тромбоцитов участвует в механизмах адгезии и агрегации, за счет рецепторов: Ib, Ib, IIIa, рецепторы к АДФ, адреналину, тромбину, фактору Ха, фактору агрегации тромбоцитов, коллагену[7].

Гиаломер тромбоцитов включает в себя: открытую систему канальцев, функция которой состоит в поглощении веществ и экзоцитозе содержимого тромбоцитарных гранул; плотные трубочки (производное комплекса Гольджи мегакариоцитов), которые накапливают и выделяют кальций; цитоскелет. В его состав входят микротрубочки, которые формируют краевое кольцо – каркас тромбоцита и ответственный за движение и агрегацию тромбоцитов подмембранный аппарат, состоящий из микрофиламентов[8].

### **1.2.1 Участие в свертывании крови**

Свертывание крови- многостадийный процесс, включающие в себя следующие этапы: активация, адгезия, агрегация, ретракция тромба.

Первый этап свертывания крови заключается в активации тромбоцитов. Неактивированные тромбоциты представляют собой малого размера клетки дисковидной формы. В процессе активации происходит изменение формы клеток: тромбоциты распластываются по поверхности, теряя дисковидную форму, становятся округлыми и образуют по всей поверхности тонкие

отростки. Краевое кольцо сжимается, сдвигая гранулы в центр. Актин полимеризуется, образуя второе кольцо [9].

Метаболическая реакция тромбоцитов представляет собой активацию ферментов: мембранных фосфолипаз, циклооксигеназы, тромбоксансинтазы. В активированном состоянии данные ферменты синтезируют арахидоновую кислоту из фосфолипидов мембраны. Из арахидоновой кислоты в тромбоцитах синтезируются эйкозаноиды (в основном, тромбоксан A<sub>2</sub>), вызывающие спазм сосуда и способствующие агрегации. С другой стороны, в эндотелии из нее синтезируются простаглицлин, который, в свою очередь имеет противоположную роль и угнетает активацию тромбоцитов и расширяют сосуды. Ход реакции определяется балансом между тромбоксаном A<sub>2</sub> и простаглицлином. Кроме того, из плотных трубочек и гранул тромбоцитов выделяется кальций. Экспонирование прокоагулянтной мембраны является важным этапом активации тромбоцитов [9,10].

Мембрана неактивированных тромбоцитов осуществляет реакций свертывания, но не приводит к образованию активных ферментативных комплексов. Расположенные на внутренней мембране фосфолипиды отрицательно заряжены, примером может послужить фосфатидилсерин. На внешнем слое мембраны фосфатидилхолин связывает факторы свертывания хуже. При активации тромбоцита запускается целый каскад реакций. Первой реакцией происходит активация фермента скрамблаза, который способен быстро перебросить отрицательно заряженные фосфолипиды из одного слоя в другой. Такой переброс двухсторонен и является специфичным. Результатом данного процесса служит выравнивание концентрации фосфатидилсерина и устанавливается термодинамическое равновесие [10].

В ходе активации происходит секреция альфа-гранул. Значимость этой секреции для большинства белков не вполне понятна, за исключением фактор фон Виллебранда (фактор V), который содержится в альфа-гранулах в

относительно большом количестве (около 20% от плазменного пула), и при агрегации тромбоцитов его концентрация может сильно возрасть [11].

Следующим этапом является адгезия. В результате взаимодействия тромбоцита с коллагеном, посредством фибринектина, ламинина и фактора фон Виллебранда (тромбоцитарного, эндотелиального) происходит их слипание. В ответ на повреждение сосудистой стенки, поверхностные рецепторы GPVI и GPIb-IX-V образуют на тромбоцитах адгезионно-сигнальный комплекс [11].

Гликопротеин (GP) VI- иммунорецептор, главный физиологический лиганд — коллаген. Рецептор GPVI, который связывает коллаген, и GPIb (главная лиганд-связывающая субъединица рецептора GPIb-IX-V), который связывает фактор фон Виллебранда, инициируют тромбоцитарную сигнализацию, секрецию агонистов (таких как АДФ) и активацию интегрина альфа11b-бета3, который связывает фибриноген и фактор фон Виллебранда и опосредует агрегацию тромбоцитов [11,12].

Существует несколько механизмов, которые регулирует GPVI и GPIb-IX-V, основным способом является протеолиз внешнего домена металлопротеиназой, связыванием лиганда и сигнализацией. При другом пути кальмодулиновые ингибиторы, которые диссоциируют кальмодулин из цитоплазматических мест связывания на GPVI, GPIb и GPV, вызывают локальное мембранное сбрасывание внешнего домена без тромбоцитарной активации.

После адгезии происходит значительное уменьшение количества GPVI и других адгезионных рецепторов, предполагается, что данное явление необходимо для контроля взаимодействий между тромбоцитами субэндотелиальным матриксом, которые наблюдаются в ходе распределения и накопления тромбоцитов в месте роста тромба. В связи с этим происходит ограничение тромбоцитарного сигнального ответа, который имеет место при активации и секреции, и/или происходит дестабилизация тромба с

отщеплением его фрагментов либо предотвращением его распространения[12].

При агрегации тромбоцитов происходит сборка комплекса GP IIb/IIIa-рецептор фибриногена на мембране. Фибриноген образует мостики между тромбоцитами, тем самым способствуя агрегации. Кофакторами агрегации являются тромбин, адреналин, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), коллаген, АДФ[11,12].

Завершающим этапом свёртывания крови является ретракция тромба, которая обусловлена цитоскелетом тромбоцитов: комплекс актин-миозин с помощью энергии АТФ передает усилия на нити фибрина и тем самым уменьшает объем тромба до 50%[12].

### **1.2.2 Источники АФК в тромбоцитах**

Тромбоциты как в активном, так и в инактивированном состоянии продуцируют АФК, в том числе: супероксид-анион радикал, гидроксильный радикал и пероксид водорода. Теоретически, в качестве источников свободных радикалов в тромбоцитах могут выступать:

- Система НАД(Ф)Н-оксидазы на мембранах
- Система окисления арахидоновой кислоты (ЦОГ и ЛОГ)
- Микросомальные монооксигеназы эндоплазматического ретикулума
- Цитоплазматическая ксантинооксидаза
- Респираторная цепь митохондрий

НАД(Ф)Н-оксидаза- мультикомпонентный фермент, состоящий из двух основных субъединиц: главной каталитической субъединицы gp91phox и регуляторной p22phox. Цитозольные регуляторные части составляют белки p47phox, p67phox, p40phox и малые ГТФ-азы Rac [14].

Данный фермент принадлежит к семейству оксидоредуктаз, имеет семь изоформ. АФК в НАД(Ф)Н-оксидазе вырабатывает белок NOX, что является отличительной особенностью от других оксидаз. Изоферменты NOX имеют различную внутриклеточную локализацию, характер экспрессии, структуру, механизмы активации, каталитический механизм образования АФК и функции. НАД(Ф)Н-оксидаза катализирует реакцию восстановления молекулярного кислорода до супероксиданион-радикала [14,15].

SAP, высвобождаемый в ходе работы НАД(Ф)Н-оксидазы, служит предшественником других АФК (перекиси водорода и гидроксильного радикала) и так же является негативным регулятором NO. Сборка активной НАД(Ф)Н-оксидазы осуществляется путем фосфорилирования p47phox, что может быть опосредовано протеинкиназой С. Субъединица p47phox непосредственно взаимодействует с мембраносвязанным продуктом PI3-киназы PI(3,4)P и p22phox посредством N-концевых phox-гомологичного домена и Src-гомологичного домена-3 (SH3) - доменов; а также с p67phox, которая, в свою очередь, взаимодействует с Rac1. При активации комплекса переходит превращает НАД(Ф)Н в НАДФ<sup>+</sup> и производство SAP. НАД(Ф)Н-оксидаза активируется в ответ на различные стимулы [15].

Источником свободных радикалов в клетке являются полиненасыщенные жирные кислоты. В реакциях основная роль принадлежит арахидоновой кислоте.

Под влиянием определенных факторов происходит отделение арахидоновой кислоты (АК) от фосфолипида. АК выходит в цитозоль и, в зависимости от типа клеток, превращается в разные эйкозаноиды [16].

В клетках имеется два центральных пути превращения АК: циклооксигеназный (синтезирующий простагландины, простациклины и тромбоксаны) и липоксигеназный (образованием лейкотриенов). Реакции превращения арахидоновой кислоты в простагландин с помощью ферментов циклооксигеназа и липоксигеназа проходят через радикальные метаболиты [15,16].

На начальном этапе происходит превращение АК в нестабильный промежуточный эндопероксид, необходимый для образования тромбоксана А<sub>2</sub>. Циклооксигеназа осуществляет циклооксигеназную и пероксидазную каталитические реакции. Итогом циклооксигеназной реакции служит последовательное присоединение к молекуле арахидоновой кислоты двухмолекул кислорода в положение С<sub>11</sub> и С<sub>15</sub>. В следствии этого происходит циклизация углеродного скелета и образование промежуточного гидроперокси-эндопероксида[16].

В процессе пероксидазной реакции происходит образование P<sub>GH</sub>2 в ходе двухэлектронного восстановления 15-гидропероксидной группы простагландина P<sub>GG</sub>2 в гидроксильную группу. В процессе работы циклооксигеназы образуются промежуточные свободно-радикальные продукты, которые могут быть зарегистрированы методами ЭПР и хромато-масс-спектрометрии[17].

Еще одна система, способная вырабатывать свободные радикалы, это ксантинредуктаза. Известно, что при окислении ксантина или гипоксантина ксантиоксидазой образуется САР. Ксантинредуктаза – фермент, последовательно катализирующий окисление гипоксантина в ксантин и затем в мочевую кислоту. Это димерный белок, каждый из мономеров которого включает в себя два ФАД, два молибдено-птерина и восемь железосерных кластеров[18].

Механизм работы этого фермента достаточно сложен: превращение ксантиндегидрогеназы в ксантинооксидазу это быстрый физиологический механизм АФК-сигналинга. Уровень ксантинооксидоредуктазы невысок, но может повышаться при влиянии липополисахаридов, стероидных гормонов, а также при сердечной недостаточности, гипоксии и ишемии конечностей.

Продуцируемые ксантинооксидазой свободные радикалы участвуют в таких процессах как: повреждение микроциркуляторного русла, реперфузионное повреждение, полиорганная недостаточность. Иггибиторы

ксантинооксидазы являются аллопуринол, оксипуринол и фитиновая кислота[19].

Еще одним мощным источником генерации супероксидных анионов в клетках являются митохондрии. При работе митохондриальной дыхательной цепи образуется супероксидный анион-радикал, часть которого теряется. Сам комплекс состоит из четырех комплексов, из которых два образуют АФК: комплекс I, НАДН- убихинон оксидоредуктаза, и комплекс III, убихинол-цитохром с оксидоредуктаза[19].

После утечки  $Ca^{2+}$  с дыхательного комплекса происходит его накопление на матриксной стороне мембраны. При нарушениях работы ДЦ митохондрий, либо самой митохондрии возрастает количество АФК. АФК включаются в сигнальные процессы, активируя факторы транскрипции и коактиваторы, редокс-чувствительные белки. Исходя из этого предполагается, что, продуцируемый митохондриями  $Ca^{2+}$ , вносит свой вклад в общий пул АФК в тромбоцитах[18,19].

Окислительный стресс в тромбоцитах приводит к повреждению ДНК митохондрии, что является началом апоптоза [19].

### **1.2.3 Антиоксидантная защита**

Защитную роль при возникающем увеличении АФК играет антиоксидантная система. Процесс ингибирования тромбоцитов возможен путем удаления внутриклеточных АФК. Среди средств антиоксидантной защиты у тромбоцитов выделяют супероксиддисмутазу (СОД). Данный фермент катализирует реакцию дисмутации супероксид-анион радикала. В одном человеческом тромбоците содержится примерно 1 фемтограмм СОД, что составляет около 1/5 того, что имеется в лейкоцитах[20].

Альфа-токоферол- ингибитор тромбоцитов, способный дозозависимо угнетать агрегацию, высвобождая серотонин в ответ на АДФ, адреналин и коллаген. Данный эффект обусловлен снижением биодоступности  $Ca^{2+}$  в тромбоцитах.



Так же известно, что аскорбиновая кислота и трансресвератрол снижают выработку САР тромбоцитами. В последних исследованиях на эту тему предполагается, что витамины Е и С также обладают прооксидантными эффектами[19,20].

### **1.3 Физиология и морфология нейтрофилов**

Нейтрофилы- лейкоциты крови, доминирующая популяция гранулоцитов периферической крови. Диапазон содержания в среднем колеблется от 47 до 75 % в лейкоцитарной формуле.

Нейтрофилы относятся к группе полиморфоядерных лейкоцитов, их созревание в костном мозге сопряжено с изменениями структуры(уменьшается ядро, исчезают ядрышки, происходит сегментация), метаболизма и свойств. Период созревания варьируется от 8 до 14 суток, из них 6 суток отводится на первоначальную фазу созревания нейтрофилов от миелобласта до метамиелоцита. В дальнейших этапах нейтрофилы приобретают способность к адгезии, фагоцитозу, а на их мембране появляются рецепторы к хемотоксинам[21].

Время нахождения клеток в кровеносном русле очень мало (6–8 часов), так как эти клетки быстро мигрируют в ткани, последующее разрушение происходит там же. Зрелые сегментоядерные нейтрофилы представляют собой клетки округлой формы, диаметром 7–12 мкм. Ядро клеток состоит из 3–4 сегментов, соединенных тонкими нитями хроматина[22].

У нейтрофилов мало митохондрий, рибосом, комплекс Гольджи невелик, эндоплазматический ретикулум редуцирован. Главный источник энергии – гликоген, основная форма метаболизма – гликолиз. В процессе фагоцитоза и метаболического респираторного взрыва при участии гексозомонофосфатного шунта потребляется до 30 % метаболизированной глюкозы. Генетически детерминированным апоптоз определяет кратковременность существования нейтрофилов (до 4 суток).

В цитоплазме нейтрофилов содержится большое количество первичных и вторичных гранул. Первичные гранулы составляют 30 %, содержат набор ферментов, главным образом гидролитических, и являются типичными лизосомами. Лизосомы характеризуются высоким содержанием миелопероксидазы, катионных белков, мукополисахаридов. В лизосомах локализована примерно 1/3 лизоцима, обеспечивающего деполимеризацию мукополисахаридов бактериальных клеток, способствующего последующему гидролитическому расщеплению бактерий при участии лизосомальных ферментов. При фагоцитозе нейтрофилы активно выделяют содержимое лизосом в окружающую среду, где проявляются эффекты лизосомальных гидролаз. Вторичные гранулы образуют типичную специфическую зернистость нейтрофилов и содержат гликоген, липиды, ряд ферментов, а также лизоцим[21,22].

Нейтрофилы способны сохранять функциональную активность даже в неблагоприятных условиях, за счет способности получения энергии в процессе анаэробного гликолиза (характерно для воспаленных тканей, плохо кровоснабженных, отечных). Основным субстратом гликолиза является глюкоза, в меньшей степени – галактоза и фруктоза, а также гликоген. Расщепление глюкозы в нейтрофилах может осуществляться по пентозофосфатному пути. Роль дыхания в жизнедеятельности нейтрофилов невелика. В нейтрофилах имеется достаточный набор ферментов гликолиза, пентозо-фосфатного окисления глюкозы, причем энергия гликолиза используется для реализации фагоцитарной и двигательной активности, а пентозофосфатный путь окисления глюкозы играет роль в обеспечении реакций синтеза жирных кислот. Последние, как и углеводы, используются нейтрофилами в качестве источников энергии[22,23].

От деятельности нейтрофилов зависит интенсивность фагоцитоза и продукция гуморальных неспецифических факторов защиты – комплемента, лизоцима, интерферона, обеспечивающих бактерицидную активность сыворотки крови, а также миелопероксидазы, лактоферрина, катионных

белков. Способность к фагоцитозу нейтрофильных лейкоцитов обусловлена рядом особенностей, в частности высокой двигательной активностью. Нейтрофилы первыми прибывают в место повреждения тканей за счет целенаправленного движения клеток к объектам фагоцитоза (хемотаксис) [24].

### **1.3.1 Генерация активных форм кислорода нейтрофилами**

Процесс поглощения чужеродных частиц сопровождается «дыхательным взрывом» - интенсивным потреблением кислорода, направленным на генерацию АФК.

За генерацию АФК в нейтрофилах отвечают НАДФН - оксидазный комплекс и миелопероксидаза. В цитоплазме нейтрофилов присутствует две изоформы NO, которые синтезируются NO-синтазой, но не имеют большого вклада в реализации «дыхательного взрыва». Активность генерации АФК связано с интенсивностью работы НАДФН -оксидазы [23].

НАДФН-оксидаза – белковый комплекс, локализованный в составе плазматической мембраны и в цитоплазме. Мембраносвязанный компонент составляют белки: gp91phox (в составе которого присутствует гемм) и p22phox, а также малого G-белка Rap1A. Белки p22phox и gp91phox вместе с FAD, который отвечает за связывание НАДФН, формируют гетеродимерный флавоцитохром b558. Его функция заключается в переносе электронов от цитоплазматического НАДФН на молекулу внеклеточного кислорода. Кроме того, имеются исследования, в которых gp91phox наделяют свойствами транспортера протонов из клетки во внеклеточную среду и представляют его каналом [23,24].

Белки p47phox, p67phox, p40phox, малый G-белков Rac2, Cdc42, пероксиредоксин p29 составляют цитозольную часть НАДФН-оксидазы. В этой части происходит восстановление тиоредоквина, за счет фосфолипазной и пероксидазной активности. Цитозольные белки, кроме

малого G-белка Rac2, ассоциированы в 260 кДа комплекс, для которого необходимым компонентом является ионы  $Mg^{2+}$ [22].

В инактивированных клетках белки НАДФН-оксидазы локализуется в разных частях клетки. При активации нейтрофила происходит сборка НАДФН-оксидазного комплекса, в результате чего происходит генерация супероксидного анион-радикала. Наряду с этими процессами происходит повышение в клетке уровня свободной арахидоновой кислоты, которая вызывает синтез лейкотриенов[24].

Миелопероксидаза(МПО)- гемсодержащий фермент нейтрофилов, занимающий 5 % от общего объема клетки. Появление МПО впервые происходит на уровне промиелоцита в азурофильных гранулах, после активации происходит ее выделение агонистами[25].

Основная роль МПО связана с её функциональной возможностью формировать прооксиданты, которые оказывают защитную роль клетки против инфекционных факторов, в особенности, грибковой флоры.

Продукты, в катализе которых непосредственно участвует данный фермент, являются сильными окислителями, реактивными производными азота и свободными радикалами, которые в свою очередь вызывают перекисное окисление липидов и способно вызвать модификацию белков. [25,26].

### **1.3.2 Адгезионное взаимодействие нейтрофилов с эндотелием**

В организме здорового человека нейтрофилы находятся в интактном состоянии, они не способны адгезировать на эндотелий, поэтому равномерно распределяются в кровяном потоке и их скорость определяется физическими параметрами скорости кровотока, величиной диаметра просвета сосудов и жесткостью нейтрофилов.

Барьерную функцию и ингибирование адгезии нейтрофилов к эндотелию в гликокаликсе выполняют гликозаминогликаны (гепарансульфат, гиалуроновая кислота). При ферментативном разрушении

гликокаликсапроисходит оголение эндотелия, что делает его доступным для адгезии нейтрофилов[24,26].

Взаимодействие между нейтрофилами и активированным эндотелием является центральным событием при воспалении. Последовательно проходят такие этапы как: адгезия, миграция нейтрофилов и затем эти процессы вызывают нарушение проницаемости эпителия.

Обратимая адгезия нейтрофилов к эндотелию критична для их движения. Под действием провоспалительных агентов происходит плотный адгезионный контакт и в процессе киллинга бактерий приводит к разрушению и близлежащих тканей[27].

Для активации нейтрофилов необходимо одновременное соблюдение двух условий: их стимуляция воспалительными медиаторами, адгезионная поверхность. Контакт между клеткой и поверхностью осуществляется по средствам интегринов семейства  $\beta 2$ , связывающиеся с лигандом ICAM, находящимися на эндотелии[25].

Повышение содержания цитокинов в крови, и гипоксия считаются главными факторами, влияющими на адгезию. Ишемия не вызывает повреждения клеток эндотелия, однако значительно увеличивает адгезивность, делает их более чувствительными к действию медиаторов. Следующим этапом считается реперфузия ишемизированных тканей, которая приводит к взрывной наработке кислородных радикалов нейтрофилами, макрофагами и эндотелиальными клетками, инициируя воспаление и повреждение тканей[26,27].

Адгезия нейтрофилов может играть решающую роль в заболеваниях, связанных с длительной ишемией и последующей реперфузией, таких как инфаркт миокарда, инсульт, шок, трансплантация органов, ожоги, краш-синдром. Чрезмерная нерегулируемая адгезия нейтрофилов может привести к повреждению эндотелия протеазами и оксидантами. Активированные нейтрофилы в первую очередь негативно влияют на сосуды микроциркуляции [27].



## **1.4 Хемилюминесценция клеток и тканей**

Открытие собственного слабого свечения клеток животных и растений принадлежит отечественному ученому А.Г. Гурвич [29].

Собственное свечение тканей обусловлено реакциями трех типов:

— реакции перекисного окисления липидов. Цепное окисление представляет собой реакцию, субстратами которой служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), входящие в состав липидов биологических мембран и липопротеинов (ЛК), и молекулярный кислород, а продуктом – гидропероксиды ПНЖК (ЛКОН).

— реакции АФК, заключающиеся в образование синглетного кислорода в реакциях между кислородными радикалами, пероксидом водорода и гипохлоритом.

— реакции с участием пероксинитрита.

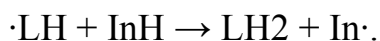
Собственная ХЛ клеток представляет собой сверхслабое свечение и для его обнаружения требуется чувствительная аппаратура и значительное количество исследуемого материала. Так же к недостаткам метода можно отнести, что в биологических объектах реакцию могут вызвать многие активные частицы (радикалы и пероксиды) и в связи с этим метод не может являться специфичным. Но для преодоления данной проблемы используют ХЛ- зонды: люминол, люцигенин и кумарин [30].

### **1.4.1 Люминол-зависимая хемилюминесценция клеток**

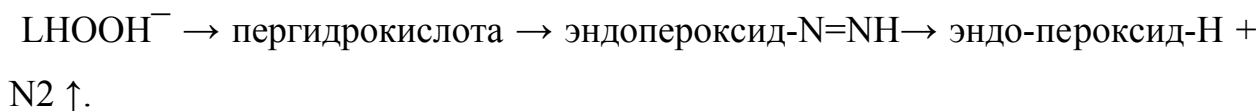
Большое применение измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови получило для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета. Взаимодействие чужеродного объекта с фагоцитирующей клеткой запускает каскад физиологических и метаболических процессов, в начале которых происходит взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с различными лигандами, включая

иммунные комплексы. ЛХЛ вызывается окислением люминола АФК и хлора и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода. Если изложить механизм реакции последовательно, то в упрощенном виде он происходит в три этапа[32].

Первая стадия – люминол окисляется сильным оксидантом, например, окисленной формой металла или радикалом. Образовавшийся окисильный радикал люминола вступает в реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем R·, подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта InH:



Второй этап в развитии ХЛ-реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофалазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом. Собственно, сама ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида (LOOH) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-пероксиди[гидроксиметиленил]фениламин):



В завершающем этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула монопротонированной аминфталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света. Путь превращения гидропероксидного ключевого продукта до электронно-возбужденной аминфталевой кислоты – один и тот же при действии многих оксидантов. Но непосредственное образование гидропероксида может идти различными способами[31,32]



#### 1.4.2 Люцигенин-зависимая ХЛ клеток

Люцигенин-зависимая ХЛ клеток используется для определения супероксидного радикала в живых клетках, которая имеет важную роль в клеточной сигнализации. В силу высокой чувствительности люцигенина в качестве ХЛ-зонда на супероксидный радикал его применяют для обнаружения  $\cdot\text{OO}^-$  при окислении ксантина или гипоксантина ксантиноксидазой, НАДФН цитохром-редуктазой микросом, НАДФН-оксидазой клеток фагоцитов, и чувствительными к дифенилениодониуму [31,33].

Популярность данного метода обусловлена тем, что требуется небольшое количество биологического материала, необходимого для того, чтобы сигнал, вызванный  $\cdot\text{OO}^-$ , превышал фон в разы [34].

В большинстве клеток Люц-ХЛ определяется выделением супероксида дыхательной цепью митохондрий. Данная особенность может быть связана с тем, что люцигенин накапливается в матриксе митохондрий, куда попадает  $\cdot\text{OO}^-$ , образуемый дыхательным комплексом I, но также и с тем, что в нефагоцитирующих клетках митохондрии образуют больше супероксида, чем НАДФН-оксидаза клеточных мембран.

Нейтрофилы бедны митохондриями, в отличие от тканевых макрофагов и их предшественников – моноцитов крови. В последних основным источником супероксида также служат именно митохондрии [35].

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Материалы**

На базе отделения реанимации и интенсивной терапии МБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича» г. Красноярска обследовано 45 пациентов с ИБС в возрасте 30 – 65 лет. Контрольная группа состояла из 16 практически здоровых добровольцев аналогичного возрастного диапазона.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

### **2.2 Методы исследования**

Заборы крови были произведены натощак утром (с 8-9 часов). Для выделения фракции нейтрофилов использовали метод по градиенту плотности фиколл- верагрофина, в последующем производили очистку от прилипающих клеток. При помощи камеры Горяева подсчитывали количество клеток. Для исследования ХЛ- активности использовали 1 млн. выделенных клеток нейтрофилов.

Для выделения эритроцитов так же использовали венозную кровь, смешивали её с 2,75% 5,5-водным цитратом натрия и отстаивали плазму. Производили процесс отмывания клеток путем добавления буфера и центрифугированием. Количество тромбоцитов, аналогично нейтрофилам, подсчитывали в камере Горяева и доводили до концентрации в 1 млн. клеток и проводили ХЛ- анализ.

### 2.3 Определение хемилюминисцентной активности нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови

Для измерения ХЛ- реакции использовали реакцию смесь состоящую из 20 мкл донорской сыворотки, 50 мкл люцигенина (“Sigma”, США) в концентрации  $10^{-5}$  М, для определения индуцированной- ХЛ добавляли 40 мкл опсонизированного зимозана, 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной ХЛ или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной. Для оценки спонтанной и индуцированной ХЛ использовали 36- канальный анализатор в течение 90 минут.

Результаты ХЛ анализа исследовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности ХЛ ( $T_{max}$ ), значение максимума интенсивности ХЛ ( $I_{max}$ ), площадь под кривой ХЛ ( $S$ ). Индекс активации ХЛ (ИА) рассчитывали, как соотношение площади кривой ХЛ, индуцированной зимозаном (в исследование нейтрофилов) и АДФ (в исследование тромбоцитов), к спонтанной ХЛ ( $S_{инд.} / S_{спонт.}$ ). Индекс активации (ИА) определяли по формуле:

$$ИА = S_{индуцированная} / S_{спонтанной},$$

$S_{индуцированная}$  – величина площади под кривой ХЛ индуцированной зимозаном (относительных единиц).

$S_{спонтанная}$  – величина площади под кривой ХЛ не индуцированной (относительных единиц).

## **2.4 Статистические методы исследования**

Все результаты исследования были внесены в электронные таблицы MSExcel 2010, была сформирована база данных, на основе которой при помощи пакета прикладных программ и Statistica 7,0 производился статистический анализ. Для описания выборки использовали подсчет медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ- аденозиндифосфат

АФК- активный формы кислорода

ДК- дыхательный комплекс

ДЦ- дыхательная цепь

ИБС- ишемическая болезнь сердца

ИХЛ- индуцированная хемилюминесценция

ЛП- липопротеины

ЛПНП- липопротеины низкой плотности

ЛОГ- липоксигеназа

ЛюцХл- люцигенин- зависимая хемилюминесценция

МПО- миелопероксидаза

НАДН- восстановленный никотинамидаденинуклеотид

НАД(Ф)Н- восстановленный никотинамидаденинуклеотидфосфат

ПНЖК- полиненасыщенные жирные кислоты

СОД- супероксиддисмутаза

СР- свободные радикалы

СХЛ- спонтанная хемилюминесценция

ХЛ- хемилюминесценция

ХС- холестерин

ЦОГ- циклооксигеназа

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Горбачев, В.В. Ишемическая болезнь сердца: учебник/В.В. Горбачев.- Москва: Высшая школа, 2007.- С.153
2. Крюков, Н.Н. Современные аспекты клиники, диагностики, лечения, профилактики, медицинской реабилитации, экспертизы ишемической болезни сердца /Н.Н.Крюков, Е.Н. Николаевский, В.П. Поляков // Вестник: научно- практический журнал. - Самара, 2010. - №12– С.651.
3. Рабсон, А Основы медицинской иммунологии/ А. Рабсон, А. Ройт, П. Девлз // Российский иммунологический журнал. - Москва, 2006. - №7 - С.320.
4. Владимиров, Ю.А. Сверхслабое свечение митохондрий и его связь с ферментативным окислением липидов/ Ю.А. Владимиров, О.Ф. Львова, З.П. Черемисина// Российский медицинский журнал. – Москва, 2008. - № 31.-С.507-514.
5. Матвеева, Н.С. Активированная хемилюминесценция как метод изучения свободнорадикальных реакций в клетках /Н.С.Матвеева, Е.В. Проскурина, Ю.А. Владимиров // Биохимия журнал. – Москва, 2012, № 5. - С.99-100.
6. Захарова, Н.О. Возрастные особенности агрегации тромбоцитов и микроциркуляции при сердечно-сосудистой патологии / Н.О.Захарова, Е.В.Тренева, О.Н. Ивкина// Врач журнал. – Томск, 2014. - №6. - С.67-71.
7. Полимова, А.М. Активированная хемилюминесценция как метод оценки радикалообразующей способности ткани мозга/ А.М.Полимова, Г.Р. Хакимова, Г.К. Владимиров// Технологии живых систем. – Москва, 2012.-№ 10.- С.214-218.
8. Гурвич, А.Г. Проблема митогенетического излучения: учебник / А.Г. Гурвич, Л.Д. Гурвич.-СССР: Наркомздрава, 1945.- С. 429- 452.

9. Тарусов, Б.Н. Изучение сверхслабой спонтанной люминесценции животных клеток/Б.Н. Тарусов, А.И. Поливода, А.И. Журавлев //Биофизика журнал. – Москва, 2001.- № 6. -С.490- 492.
- 10.Васильева,О. В. Действие антиоксидантов на кинетику цепного окисления липидов в липосомах/ О.В. Васильева, О.Б. Любицкий, Г.И.Клебанов//Биологический журнал. - Томск, 2008. -№2.-С.177-183.
- 11.Кривохижина, Л.В.Хемилюминесценция тромбоцитов, использование методахемилюминесценции для определения активности тромбоцитов/ Л.В. Кривохижина, С.А.Кантюков.,Е.Н. Ермолаева// Вестник Тюменского государственного университета.- Томск, 2013 -.№6. -С.8-12.
- 12.Беленков, Ю. Н.Сердечно-сосудистый континуум/Ю. Н.БеленковВ. Ю.Мареев, А. Л.Мясникова // Сердечная недостаточность. –Санкт-Петербург, 2002. -№1.-С.7-10.
- 13.Бондарев Е. А. Значение стратификации риска и оценки эндотелиальной функции у больных артериальной гипертензией // Вестник Смоленского государственного университета. –Смоленск, 2002. –С.135.
- 14.Воробьева, Е.Н. Взаимосвязь различных факторов риска развития ишемической болезни сердца/ Е.Н.Воробьева, Б. Я.Варшавский, А. Н.Тушев // Вестник РАМН. – Москва, 2001. - №2. –С.31-35.
- 15.Конколь К.Ю. Вторичная профилактика ишемической болезни сердца, протекающей с основными факторами риска, гипертонической болезни метаболически активными препаратами /К.Ю.Конколь// Сибирский научный медицинский журнал. –Новосибирск, 2004. –С. 392.
- 16.Сидоренко Б.А. Новое в лечении сердечнососудистых заболеваний и тромбозов/Б.А. Сидоренко // Кардиологический вестник. – Москва, 2005. - №4. –С.86-92.
- 17.Фархутдинов, Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине/



- Р.Р.Фархутдинов, В.А.Лиховских//Издательство БГМИ.- Уфа, 2005. – С.90-94.
- 18.Савченко,А. А. Основы клинической иммунометаболизма: учебник/ А. А.Савченко,А. Г. Борисов .–Новосибирск: Наука,2012. –С.25-35.
- 19.Савченко,А.А. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните: учебник/ А. А. Савченко, Д. Э. Здзитовецкий, А. Г. Борисов.–Новосибирск: Наука, 2013. –С.80.
- 20.Березов,Т.Т. Биологическая химия: учебник /Т.Т. Березов,Б.Ф.Коровкин.–Москва:Медицина,1998. –С.704-708.
- 21.Грачева, Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток/Т.А. Грачева //Клиническая лабораторная диагностика. - Новосибирск,2008.-№7-С.53-56.
- 22.Борисов,А.Г. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы/ А.Г. Борисов, А.А. Савченко, С.В. Смирнова // Сибирский медицинский журнал.- Томск.-2008.-№3.- С.1318
- 23.Авзалетдинова, А. Р. Хемилюминесценция крови и мочи в дифференциальной диагностике ГЛПС /А.Р.Авзалетдинова, Р.М. Фазлыева, Р.Р. Фархутдинов // Клиническая лабораторная диагностика .- Москва, 2005. - №5. –С.45-47.
- 24.Takeya,R Regulation of novel superoxide producing NAD(P)H oxidases/ R. Takeya, H.Sumimoto // Antioxidants&redox signaling.-2006.- №9. -P.1523-1532.
- 25.Ральченко, И.В. Роль тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов в реализации связи между гемостазом и интенсивностью ПОЛ / И.В. Ральченко // Кардиология и сердечно-сосудистая. -Москва, 2008. – С.42.

26. Irani K. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras- transformed fibroblasts/ K.Irani, Y.Xia, J.L. Zweier// Science.- 2007.-№5306.-P.1649-1652.
27. Iverson, D. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay/ D. Iverson., J. K. Spitznagel // The Journal of clinical investigation. - 2007.-№ 2.- P.282-290.
28. Негреску, Е.В. Антиоксиданты, перекисное окисление липидов и рецепторзависимое увеличение концентрации кальция в тромбоцитах человека / Е.В. Негреску, А.В. Лебедев, Г.Н. Балденков // Вопросы медицинской химии. - Уфа, 2002. - №2. –С.36-39.
29. Соколов И.М. Влияние антиоксидантной терапии на состояние систем энергообмена и антиоксидантной защиты у больных в остром периоде инфаркта миокарда/И.М. Соколов // Анестезиология и реанимация. – Москва, 1999.-№5.-С.21-26.
30. Wilson, M. E. Induction of chemiluminescence in human polymorphonuclear leukocytes by the calcium ionophore/ M. E. Wilson, M. A. Trush, K. vanDyke// FEBS letters.- 1978. - №2.-P. 387-390.
31. Цветков, В. В. Биология дендритных клеток / В. В. Цветков, Т. В. Сологуб, И. И. Токин // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – Санкт- Петербург, 2014. – №3. – С. 69.
32. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз/ М.А.Пантелеев, А.Н. Свешников// Онкогематология.- Москва, 2014. - №2. - С.65-73.
33. Тюлькова, Н.А. НАД(Ф)Н- реагент для билюминесцентного анализа/ Н.А. Тюлькова, Э. В. Антонова // Бюллетень сибирской медицины. - Томск, 2001. -С.17.
34. Rebmish, S.J. Further evidence that lucigenin- driven chemiluminescence monitors mitochondrial superoxide generation in rat alveolar


macrophages/S.J. Rembish, M.A. Trush// Free Radic Biol Med.-2004.-№2.-  
P.117-126.

35. Alceri, R. C. Phagocytic leucocyte oxigenationactivites and  
chemiluminescence / R. C. Alceri, M. Nakano// Methods Enzymol.-2006. -  
№133. -P.449

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

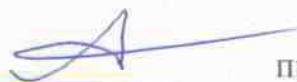
« 7 » июня 2018 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология


Хемилюминесцентная активность тромбоцитов и нейтрофилов у больных  
ишемической болезнью сердца в постоперационный период

Научный руководитель



профессор, д.м.н А.А. Савченко

Выпускник

  
подпись, дата

Ю.А. Дубынина

Красноярск 2019