

Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме “ Функциональная и метаболическая активность нейтрофилов при панкреонекрозе” содержит 50 страниц текстового документа и 35 источников использованной литературы.

Ключевыми словами по данной теме являются: хемилюминесценция, панкреонекроз, нейтрофильные гранулоциты, респираторный взрыв, фагоцитоз, синтез АФК, метаболизм нейтрофилов.

Цель работы: изучить функциональную и метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов у больных с панкреонекрозом.

Проводилась оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов у людей больных панкреонекрозом и здоровых людей методом хемилюминесценции, а также оценка активности ферментов методом биолюминесценции. Был проведен анализ и сравнение полученных результатов.

Для адекватной оценки функциональной активности нейтрофилов и синтеза ими АФК, у больных панкреонекрозом, были изучены и проанализированы параметры люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Результаты проведенного исследования выявили изменения показателей хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у людей больных панкреонекрозом в сравнении с показателями контрольной группы. А именно увеличение максимума интенсивности свечения, время выхода кривой на максимум интенсивности и показателя площади под кривой при спонтанной люминол-зависимой ХЛ. Также увеличение интенсивности свечения и площади под кривой при зимозан-индуцированной люминол-зависимой ХЛ. При спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой ХЛ было выявлено увеличение площади под кривой у людей с панкреонекрозом. Было выявлено, что у людей страдающих панкреонекрозом интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови выше, чем у здоровых людей. Биолюминесцентный

метод показал увеличение активности НАДФН-зависимой ГДГ и снижение активности ЛДГ у больных панкреонекрозом относительно контрольной группы, что свидетельствует об изменении работы метаболических путей и, как следствие, функциональной активности нейтрофилов у людей страдающих панкреонекрозом.

Содержание

Введение.....	5
1. Литературный обзор.....	7
1.1. Особенности иммунопатогенеза панкреонекроза.....	7
1.2. Основы механизма реализации функциональной активности нейтрофилов при воспалительных процессах.....	12
1.2.1.Изменение фенотипа	13
1.2.2.Фагоцитоз	16
1.2.3.Респираторный взрыв нейтрофилов	23
1.3. Метаболизм и связь с функциональной активностью	26
2. Методика.....	33
2.1. Объект исследования.....	33
2.2. Методы исследования	33
2.3. Определение хемилюминесцентной активности нейтрофилов периферической крови.....	34
2.4. Определение биолюминесцентной активности.....	35
2.5. Статистические методы исследования	37
3. Результаты исследования и их обсуждение.....	38
Заключение	39
Список сокращений	40
Список литературы	41

Введение

Актуальность проблемы изучения ранней диагностики тяжелых форм острого панкреатита обусловлена сохраняющейся высокой летальностью и длительными сроками госпитализации данной группы пациентов. Основными причинами летальных исходов неизменно остаются «ранние токсические» и «поздние септические» осложнения.

Важное место занимает анализ активности неспецифического иммунного ответа, определяемый путем оценки функциональной активности нейтрофилов. При анализе хемилюминесценции фагоцитов выявляется образование активных кислородных радикалов, что также может использоваться как критерий интенсивности дыхания клетки при фагоцитозе [1].

Нейтрофилы играют многогранные функции при различных патологических состояниях, высвобождая различные эффекторные молекулы и цитокины. Так как панкреатит является воспалительным заболеванием, а в воспалительном процессе нейтрофилы играют значительную роль как первых клеток реагирующих на него, так и производителей активных форм кислорода, что усугубляет процесс воспаления. Более того, в любом очаге воспаления в результате первичного повреждения, либо уже в результате деятельности фагоцитов будет много мертвых клеток самого организма, закисленная среда, различные метаболиты, которые способны сами вызывать воспалительную реакцию. При определённых условиях попадания их в кровеносное русло возникает системное воспаление в других органах. По этому любой тяжелый воспалительный процесс опасен возможностью выхода воспаления на системный уровень вплоть до полиорганного воспаления и смерти. Именно поэтому течение панкреатита зависит не только от степени поражения ферментами, но и от реакции иммунной системы.

Целью данной работы явилось изучение функциональной и метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с панкреонекрозом. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить особенности спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с панкреонекрозом;
- Изучить особенности спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с панкреонекрозом;
- Изучить особенности метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов биолюминесцентным методом;

1. Литературный обзор

1.1. Особенности иммунопатогенеза панкреонекроза

Острый панкреатит (ОП) - это заболевание с воспалением поджелудочной железы различной степени тяжести проявления от легкой боли в животе – до смертельного исхода. ОП характеризуется 3-я фазами. В 1-й фазе происходит активация ферментов и клеточные повреждения вызывают ранние симптомы. Во 2-й фазе, системно воспалительные реакции и интрапанкреатической части воспалительных реакция протекает путем высвобождения про воспалительных и противовоспалительных медиаторов. В 3-й фазе – осложнения конечно [2].

Острый панкреатит является причиной 5-10% госпитализаций в хирургические стационары. Общая смертность от ОП в мире от 5-10%. Примерно у 80% пациентов острый панкреатит проявляется в лёгкой форме, но у 20% он имеет тяжёлую форму с некрозом паренхимы поджелудочной железы, ведущее к смертности до 27% [3,4].

В результате повреждения ацинарных клеток поджелудочной железы, увеличенной выработки панкреатического секрета и при затрудненном его оттоке образуется острый панкреатит, вследствие чего происходит острое повышение давления в панкреатическом протоке с последующим запуском каскада реакций, активирующего ферменты поджелудочной железы, лизосомальные ферменты. Затем активируется ферментопосредованная калликреин-кининовая система с образованием брадикинина, гистамина, серотонина, и их тканевых эффектов. Что приводит к образованию цитокинов. В свою очередь они увеличивают проницаемость кишечной стенки, содействуя поступлению токсинов в кровоток с образованием их депо в различных тканях и органах (легких, почках, головном мозге, сердце, печени, кишечнике и т.д.), что впоследствии приводит к полиорганной дисфункции. [5]

Активация липазы приводит к некрозу жировых клеток, эластазы приводит к разрушению сосудистой стенки. Активированные ферменты и продукты распада тканей, вследствие работы эластазы, попадают в кровоток и осуществляют токсическое действие на все органы и ткани.

В силу того, какие разрушающие механизмы лидируют в патогенезе, классифицируют 3 формы панкреонекроза: жировую, геморрагическую и смешанную.

Жировая форма. При повышении активности липазы, начинается разрушение жировой ткани поджелудочной железы. Липаза попадает за пределы панкреатической капсулы, тем самым вызывает появление очагов некроза в большом и малом сальнике, листках брюшины, брыжейке, внутренних органах. Жировая форма панкреонекроза завершается развитием тяжелейшего химического асептического перитонита, полиорганной недостаточности.

Геморрагическая форма. При преобладании микроциркуляторных нарушений происходит спазм сосудов поджелудочной железы, приводящий к быстрому развитию отека паренхимы. В течение некоторого времени токсемия приводит к парезу сосудистой стенки, расширению сосудов и замедлению кровотока в тканях железы. Все выше перечисленное благоприятствует повышенному тромбообразованию, а в дальнейшем – развитию ишемического некроза. Активированная эластаза вызывает разрушение сосудистой стенки сначала в толще поджелудочной железы, затем, попадая в кровоток, приводит к разрушению в других органах. В итоге это приводит к геморрагическому пропитыванию панкреас, кровоизлияниям во внутренние органы и забрюшинную клетчатку. Главным показателем геморрагического панкреонекроза является выпот в брюшную полость с примесью крови.

Смешанная форма. При условии равной активности эластазы и липазы, развивается смешанная форма панкреонекроза. В этом случае явления жирового некроза и геморрагической имбибиции выражены, одинаковы. [6]

Недавние исследования показали, что нейтрофилы играют центральную роль в эволюции SAP, опосредуя местное повреждение тканей в поджелудочной железе, а также удаленное повреждение органов и последующую смерть. На ранней стадии САП повреждение клеток поджелудочной железы вызывается аномальной активацией трипсиногена-индуцированным асептическим воспалительным сигналом, который рекрутирует воспалительные нейтрофилы в поджелудочную железу. Активированные нейтрофилы продлевают срок службы и высвобождают высокие концентрации окислителей и цитотоксических агентов, что еще больше усугубляет местное повреждение тканей поджелудочной железы. По мере того как воспаление продолжается, каскад трансмиграции нейтрофилов через эндотелиальные клетки достигает кульминации. Основанный на втором "рое" нейтрофилов, он может быстро прогрессировать и усугубляться от местного панкреатического-островкового воспаления в синдром системного воспалительного ответа, причиняя удаленный ушиб органа, синдром множественной дисфункции органа или серьезные осложнения подавляющими воспалительными реакциями.[7]

Нейтрофилы из периферической крови больных имели совершенно иную тенденцию по сравнению с нейтрофилами, выделенными от здоровых людей. Эти активированные нейтрофилы значительно увеличивали продолжительность жизни и функциональную активность, что, возможно, способствует секреции провоспалительных цитокинов, миграции и инвазии клеток, а также задержке апоптоза нейтрофилов. Таким образом, индукция апоптоза нейтрофилов может способствовать разрешению воспаления путем восстановления продолжительности жизни нейтрофилов *in vivo*. К механизмам, ответственным за активацию нейтрофилов при локальном

панкреатическом воспалении, относятся цитокин-опосредованные изменения экспрессии генов, активация комплемента в плазме крови и изменения скорости оборота ключевых белков. Например, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), ИЛ-1 и ИЛ-6 были постулированы для повышения адгезии и экстравазации нейтрофилов, увеличения проницаемости капилляров, усугубления повреждения поджелудочной железы, а также синдрома системного воспалительного ответа. Второй механизм активации нейтрофилов в периферической крови связан с высвобождением в плазме крови анафилатоксинов C3A и c5a комплемента, которые могут усиливать активацию и инфильтрацию воспаления нейтрофилами, приводя к сосудистой утечке. Кроме того, иммунные комплексы, например, комплемент iC3b ковалентно депозированный на поверхности мембран эндотелиальной клетки, может подействовать как сигнал transuding соучастник для нейтрофилов пройти оксидативный взрыв через integrin CD18 и CD11b 44. После свертывания и активации нейтрофилы прикрепляются к стенке сосуда и затем выходят из кровообращения в ткани, некоторые сигнальные сигналы, опосредованные нейтрофильными производными хемоаттрактантами, такими как лейкотриен B4 и G-связанные с белком рецепторы, делают возможной дальнюю миграцию нейтрофилов в жизненно важных тканях. Хотя рекрутированные нейтрофилы были известны как неспецифическая защитная реакция против вторгающихся микробов, чрезмерное рекрутирование и активация нейтрофилов могут привести к наличию обширной органной дисфункции наряду с массивными провоспалительными медиаторами и активными промежуточными звеньями кислорода. В результате пациенты с САП обычно умирают от полиорганной функциональной недостаточности в результате развития и прогрессирования системного воспалительного каскада-индуцированного повреждения поджелудочной железы, а не через само повреждение ткани поджелудочной железы. Почти 60% случаев смерти от САП происходят в течение первых 7-14 дней, ассоциируясь с острым повреждением легких.

Традиционно, главным вкладом нейтрофилов в центральное патогенетическое событие панкреатита считалось их высвобождение из некоторых продуктов воспаления в течение многих лет. Однако недавние экспериментальные данные убедительно показали, что нейтрофилы также играют активную роль в управлении прогрессированием панкреатита, регулируя нейтрофильно-регулируемую активацию трипсина и высвобождение сетей. Эти достижения в этой области еще больше обогатят существующую нейтрофильно-центрированную теорию панкреатита. [8]

1.2. Основы механизма реализации функциональной активности нейтрофилов при воспалительных процессах

Полиморфноядерные нейтрофилы человека (ПМН) являются наиболее распространенными ядродержащими клетками в циркулирующей крови (от 2 до 8×10^6 в мл). ПМН обладают характерными цитоплазматическими гранулами, содержащими антимикробные полипептиды, и могут продуцировать антимикробные активные формы кислорода (АФК, например, H_2O_2 и хлорной кислоты). Жизненный цикл ПМН включает созревание и высвобождение из костного мозга, циркуляцию в крови, свободное присоединение к сосудистому эндотелию и клиренс стареющей ПМН ретикулоэндотелиальной системой. Развитие нейтрофилов регулируется цитокинами, из которых главную роль играет G-CSF, а вспомогательную – GM-CSF, IL-3 и IL-6. Повышение содержания нейтрофилов в условиях воспаления регулируется IL-17, а он стимулирует выработку G-CSF.[9, 10].

В кровотоке находится только 1–2% общего числа зрелых нейтрофилов в организме. Остальные представлены в тканях, преимущественно в костном мозгу. Время их нахождения в циркуляции составляет 7–10 ч. После нейтрофилы покидают кровоток и выходят в ткани. Примерно 30% нейтрофилов, выходящих из кровотока, мигрируют в печень и костный мозг; около 20% — в легкие; около 15% — в селезенку. Основными хемотаксическими факторами для нейтрофилов служат лейкотриен B₄ и IL-8, в малых количествах вырабатываемые в тканях. Переход происходит с участием молекул адгезии (β 2-интегрины, P- и E-селектины), а также фермента эластазы, секретируемого самими нейтрофилами. Через 3–5 сут. пребывания в тканях нейтрофилы подвергаются спонтанному апоптозу, т.е. запрограммированной гибели, и их фагоцитируют резидентные макрофаги, что препятствует нанесению ущерба окружающим клеткам. Диаметр нейтрофилов составляет 9–12 мкм. Им присуща уникальная морфология: ядро сегментированное (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно

упакованным хроматином (гетерохроматином); цитоплазма содержит нейтральные гранулы, что и определяет название этих клеток [10].

При активации периферические ПМН прилипают к сосудистому эндотелию и мигрируют из сосудистой оболочки, двигаясь в направлении инфекционных или воспалительных стимулов, что значительно изменяет их поведение. При встрече с микробами ПМН могут образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (сети), высвобождать содержимое их гранул, вырабатывать медиаторы воспаления, продуцировать активные формы кислорода и поглощать микробы через фагоцитоз. После активации, ПМН может продолжать вносить свой вклад в развивающуюся воспалительную реакцию или проходить апоптоз, обычно достигающий кульминации в фагоцитозе самих ПМН тканевыми макрофагами.[9]

1.2.1. Изменение фенотипа

Так как нейтрофилам присуща характерная морфология, то существует необходимость в определении их мембранного фенотипа при специальном цитометрическом анализе. Для нейтрофилов специфична экспрессия на поверхности клетки ряда молекул: CD13 (аминопептидаза N, рецептор для ряда вирусов), CD14 — рецептора для липополисахарида (ЛПС) (представлен в меньших количествах, чем на моноцитах), β 2-интегринов (LFA-1, Mac-1 и p155/95); Fc-рецепторов [Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16)], рецепторов для компонентов комплемента (CR1, CR3 и CR4), рецепторов для хемотаксических факторов (C3aR, C5aR, рецептор для лейкотриена B4). Под влиянием ряда цитокинов (прежде всего GM-CSF) нейтрофилы экспрессируют молекулы МНС класса II (МНС-II); молекулы МНС-I экспрессируются на них конститутивно. Наиболее важные молекулы, определяющие развитие, миграцию и активацию нейтрофилов, — рецепторы для G-CSF, основного фактора, регулирующего их развитие, основного хемотаксического фактора — IL-8 (CXCR1, CXCR2) и хемокина,

определяющего связь нейтрофилов с тканями — SDF-1 (CXCR4), а также для IL-17 и IL-23. [10]

Как авангард иммунных клеток в очагах воспаления, не удивительно, что нейтрофилы переключаются в различные фенотипы с множественными функциями во время инфекции и воспаления. Специфические функции, как правило, связаны с измененными фенотипами, что определяет видные функциональные субпопуляции, адаптированные к микроокружению и характеристикам соответствующих врожденных или адаптивных иммунных стимулов.

Существуют различные вариации функциональных фенотипов нейтрофилов, которые появляются в циркулирующем компартменте нейтрофилов при тяжелом воспалении. После созревания нейтрофилы удерживаются в костном мозге через экспрессию хемокинового рецептора CXCR4 (лиганд CXCL12), в то время как CXCR2 (лиганды IL-8/CXCL1 и 2) контролирует высвобождение в периферическую кровь [11]. Воспалительные стимулы могут индуцировать высвобождение нейтрофилов, нарушая баланс в сигналах CXCR4/CXCL12 через различные механизмы. При тяжелом воспалении большое количество нейтрофилов высвобождается в кровоток из постмитотического пула костного мозга, а также из маргинального пула (т. е. нейтрофилы не свободно циркулируют, а прикрепляются к микроциркуляторному руслу). В этих условиях было ранее показано, что периферические нейтрофилы состоят из гетерогенных подмножеств с различными состояниями и функциями прайминга. Во время сильного воспаления в кровообращении появляется большое количество незрелых или перевязанных клеток, и даже нейтрофильные клетки-предшественники могут быть идентифицированы. В результате персистирующее тяжелое воспаление может привести к «костномозговому истощению» нейтрофилов, что, как полагают, неизбежно приводит к состоянию нарушенного врожденного иммунитета [12].

Нейтрофилы уже давно признаны профессиональными киллерами. Их главной задачей считалось уничтожение бактерий и грибков. Однако помимо своей прямой антимикробной функции, они так же участвуют в последующей модуляции (адаптивных) иммунных реакций при тяжелом воспалении. При этих воспалительных состояниях нейтрофилы продуцируют хемокины и секретируют содержимое гранул, которые впоследствии могут привлекать и модулировать функцию Т-клеток как прямо, так и косвенно. Например, эластаза нейтрофилов снижает экспрессию ко-стимулирующих молекул дендритными клетками, ограничивая созревание и индукцию правильного Th1-ответа. Кроме того, Т-клетки в воспалительном микроокружении могут подвергаться воздействию нейтрофильной эластазы за счет расщепления их рецепторов IL-2 и IL-6. Еще один механизм иммуномодуляции наблюдался в макрофагах после фагоцитоза апоптотических нейтрофилов. В этих условиях иммунные реакции макрофагов смещаются в сторону более противовоспалительного цитокинового профиля. Кроме того, было показано, что сами нейтрофилы продуцируют противовоспалительные цитокины, такие как IL-1ra. Прямая регуляция Т-клеточных реакций нейтрофилами постепенно становится устоявшейся концепцией. Большое количество данных свидетельствует о том, что гетерогенная группа незрелых мононуклеарных клеток и нейтрофилов, называемых миелоидными супрессорными клетками (МДСК), может подавлять Т-клеточные реакции в нескольких моделях опухоли мышей. Кроме того, было показано, что эти клетки играют определенную роль в различных моделях инфекционных заболеваний, трансплантации органов и аутоиммунных заболеваний. Однако идентификация незрелых гранулоцитарных Mдsc человека оказалась сложной задачей. В частности, их дифференцировка от зрелых фенотипов нейтрофилов, наблюдаемых в крови при остром воспалении, остается еще не установленной. Механизмы, посредством которых МДСК могут подавлять Т-клетки, включают экспрессию и секрецию аргиназы-1, которая истощает аргинин из

микроокружения. Истощение L-аргинина, который является незаменимой аминокислотой, приводит к остановке клеточного цикла Т-клеток в фазе G0-G1. Кроме того, при воспалении у человека наблюдается популяция зрелых cd62⁺ тусклых нейтрофилов, способных подавлять Т-клеточные ответы через механизм, который основан на высвобождении АФК в иммунологическом синапсе. В последнее время было обнаружено, что подобные нейтрофилы у больных септическим шоком экспрессируют аргиназу-1 и подавляют функции Т-клеток. Другой механизм, с помощью которого нейтрофилы могут ингибировать Т-клеточные реакции, - это PD-L1. Нейтрофилы, выделенные от больных сепсисом, экспрессируют поверхностный белок PD-L1, мощный индуктор апоптоза в Т-клетках. Основным механизмом экспрессии PD-L1 является интерферон-гамма-зависимый процесс. Считается, что ось PD-1-PD-L1 является важным механизмом иммунной супрессии у септических больных, индуцируя апоптоз лимфоцитов и дисфункцию моноцитов [11].

1.2.2. Фагоцитоз

Фагоцитоз-это эволюционно сохраненный клеточный процесс, который включает поглощение нежелательных частиц размером более 0,5 мкм. Фагоцитарные клетки экспрессируют широкий спектр иммунных рецепторов (также известных как рецепторы распознавания образов, PRRs) на поверхности клеток, которые позволяют им распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), присутствующие на патогенах до поглощения. Связывание патогена сопровождается кластеризацией рецепторов на поверхности клеток и запускает образование фагоцитарной чашки. Это приводит к актин-управляемому ремоделированию мембраны, которая выступает вокруг мишени, в конечном итоге обволакивая ее и заземляя, чтобы сформировать дискретную фагосомальную вакуоль. Затем фагосома созревает и подкисляется путем последующего слияния с поздними эндосомами и лизосомами, которые образуют фаголизосому.

Хотя фагоцитоз описан как рецептор-опосредованное и управляемое актином событие, этот процесс также полагается на пространственно-временную модификацию липидов, которые составляют плазматическую мембрану, таких как фосфоинозитиды (PIs) и сфинголипиды. В то время как полимеризация актина диктуется локальным накоплением фосфоинозитол-4,5-бифосфата (PI(4,5)P₂) на основе фагоцитарной чашки, деполимеризация актина зависит от превращения PI(4,5)P₂ в фосфоинозитол-3,4,5-бифосфат (PI(3,4,5)P₃). Обе модификации являются существенными, так как первая приводит к успешному расширению псевдоподий вокруг мишени, а вторая позволяет потопить частицы в цитозоле фагоцита.

Клетки, обладающие способностью к фагоцитозу, являются либо профессиональными фагоцитами, такими как макрофаги/моноциты, гранулоциты/нейтрофилы и дендритные клетки (ДК), либо непрофессиональными фагоцитами, такими как фибробласты и эпителиальные клетки. Фагоцитоз, выполняемый всеми фагоцитами, играет центральную роль в поддержании и ремоделировании тканей, в то время как фагоцитоз, выполняемый профессиональными фагоцитами, отвечает за координацию врожденного и адаптивного иммунного ответа против патогенов. Профессиональные фагоциты не только поглощают и убивают возбудителя, но и представляют собой антигены для лимфоидных клеток адаптивной иммунной системы. Это способствует высвобождению провоспалительных цитокинов и вовлечению лимфоидных клеток, что, следовательно, приводит к успешной блокаде инфекции [13].

У септических больных было показано, что незрелые нейтрофилы обладают сниженной фагоцитарной способностью. Важно отметить, что снижение фагоцитоза и увеличение количества циркулирующих предшественников нейтрофилов ассоциированы как с плохим исходом у септических больных, так и у пациентов с тяжелым воспалением [11].

Нейтрофилы активируют стереотипные программы, когда меняется окружающая среда. Как и большинство профессиональных фагоцитов, они реагируют, когда им бросают вызов громоздкие жертвы. Нейтрофилы убивают микробы через фагоцитоз, генерация оксидантных видов и активация клеточного протеолитического аппарата-процессы, которые были широко изучены в последние десятилетия. Высвобождение нейтрофильных внеклеточных ловушек (сетей) викариатов сорвано или неэффективно при фагоцитозе. Он повышает эффективность врожденного ответа, справляясь с вторгающимися микробами. Кроме того, Сети уравнивают микробные стратегии уклонения от иммунного ответа. Сети представляют собой крупные макромолекулярные структуры, которые содержат нейтрофильную ДНК, цитруллинированные гистоны и массив активных протеаз. Благодаря адгезивным свойствам нуклеиновых кислот и действию во внеклеточной среде гистонов и ферментов нейтрофилов сетки способствуют защите хозяина от различных видов микроорганизмов. Они образуют трехмерный шаблон, поглощающий и удерживающий гуморальный врожденный иммунный ответ, прототипический длинный пентраксин, пентраксин 3 и комплемент [14].

Важное значение имеет то, что формирование и экструзия сетей подразумевает драматическую перестройку внутриклеточной архитектуры нейтрофильных клеток. Деконденсация хроматина является предпосылкой для сборки сети и зависит от цитруллинирования гистонов, управляемых ферментом PAD4, действием DEK, ядерного белка хроматина, участвующего в эпигенетической и транскрипционной регуляции, а также за счет согласованного действия ферментов, которые частично комплексуется в азурофильных первичных гранулах, миелопероксидазе и эластазе. Действие эластазы отвечает за частичную протеолитическую обработку, необходимую для нарушения упаковки хроматина. Фактор фон Виллебранда адсорбируется на сетках, цитруллинированных гистонах и отрицательных зарядах нуклеиновых кислот согласуется с рекрутированием и активацией

тромбоцитов, что оказывает влияние на гемостаз и в конечном итоге способствует тромбозу. Тромбоз, инициируемый врожденным иммунитетом, также называемый “иммуотромбозом”, играет все более признанную роль в защите сосудов, ограничивая внутрисосудистый рост и гематогенное распространение инфекционных агентов. И наоборот, эндогенные механизмы, включающие DNase1 и DNase1-подобный 3, контролируют тромбогенный потенциал сетей *in vivo*, в условиях, когда микробные и стерильные стимулы отвечают за активацию нейтрофилов [15].

Нейтрофильный фагоцитоз протекает очень быстро – поглощение IgG-опсонизированных частиц происходит менее чем за 20с. Поглощение сопровождается слиянием фагоцитарной вакуоли с предварительно сформированными гранулами внутри клетки, чтобы сформировать фагосому, в процессе, называемом фагосомальным созреванием. Эти гранулы содержат гидролитические ферменты и субъединицы НАДФН-оксидазы, которые инициируют механизмы киллинга. Фагоцитоз в нейтрофилах отличается от такового в других профессиональных фагоцитах, таких как макрофаги, в которых как поглощение частиц, так и созревание фагосомы происходят значительно медленнее. Кроме того, полностью зрелая фагосома нейтрофилов имеет нейтральный pH, тогда как в макрофагах фагосома является очень кислой. Это различие может отражать влияние окислительного взрыва, который является массивным в нейтрофилах по сравнению с макрофагами, на вакуолярный pH. эффективное созревание фагоцитов в нейтрофилах также зависит от цитозольного кальция, тогда как в макрофагах слияние между лизосомами и фагосомой не зависит от кальция.

Скорость, с которой нейтрофилы могут вступать в контакт, поглощать и убивать патогенные микроорганизмы, является очевидным преимуществом с точки зрения защиты хозяина. Однако фагоцитоз и фагосомальное созревание не являются совершенными процессами, так как гранулы могут слиться с фагосомой до ее полной герметизации. Это приводит к

высвобождению цитолитического содержимого и продуктов окисления за пределы нейтрофилов, где может происходить повреждение других клеток. Фагоцитарные рецепторы нейтрофилов также могут быть задействованы иммунными комплексами или комплементом, депонированными вдоль больших поверхностей, таких как сосудистый эндотелий, который нейтрофил не может полностью поглотить. Этот так называемый фрустрированный фагоцитоз приводит к высвобождению содержимого гранул и продуктов окисления, вызывая обширное повреждение тканей. Ярким примером этого явления является тромбгеморрагический васкулит, при котором перепроизводство медиаторов воспаления, таких как TNF, приводит к значительному отложению комплемента (C3) вдоль сосудистого эндотелия. Депонированный C3 активирует рецепторы нейтрофильного CR3 (Mac-1), что приводит к массивному высвобождению гранул, что в свою очередь вызывает сосудистый распад и кровоизлияние. Бесконтрольное высвобождение нейтрофильных гранул или продуктов окисления является одной из основных причин повреждения тканей при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях [16].

Довольно большая специфика свойственна гранулам нейтрофилов, представляющим разновидность лизосом. Гранулы – это заметные особенности нейтрофилов, содержащих различные белки для уничтожения фагоцитозных патогенов и переваривания поврежденных тканей. Существует континуум гранул, проявляющийся в виде четырех уникальных подмножеств: первичных (азурофильных) гранул, содержащих миелопероксидазу (МПО) и азуроцидин; вторичных (специфических) гранул, содержащих лактоферрин; третичных (желатиназных) гранул, содержащих ММП9 (желатиназа В); и секреторных везикул. Подмножества гранул формируются последовательно в процессе гранулопоэза. Азурофильные гранулы образуются на стадии промиелоцитов; другие гранулярные подмножества образуются в процессе дифференцировки миелоцитов в сегментарные стадии клеток. Хронологическая гетерогенность гранулопоэза

может быть выяснена с помощью механизма, называемого «таргетирование по времени биосинтеза», и образование белков гранул ограничивается соответствующими стадиями миелопоэза. Интересно, что сроки синтеза подтипа гранул не полностью совпадают с экспрессией белка гранул, что приводит к гетерогенности внутри гранул одного и того же подтипа гранул.

В общих чертах неоднородность гранул выявляется по функции и активности нейтрофилов. Первичные гранулы накапливают множественные антибактериальные белки, такие как МПО, азурофильный, катепсин G, эластаза и протеиназа 3, лизоцим, ферментативно неактивный CAP37 (протеаза катионного антимикробного белка 37 КДА) (азуроцидин), NSP4 (нейтрофильная сериновая протеаза 4) и дефензины. Гетерогенность азурофильных гранул существует как в содержании белка, так и в субклеточном таргетировании. Некоторые гранулы транспортируются на поверхность клетки, в то время как другие сливаются с фагосомами. Жизненно важный член семейства Rab GTPases, Rab27, наряду с его эффектором, млекопитающим несогласованным 13-4 (Munc13-4), регулирует таргетирование гранул. Взаимодействие между Rab27a и Munc13-4 опосредует дегрануляцию нейтрофилов. Секреторные гранулы экспрессируют Rab27 и сливаются с клеточной мембраной через Munc13-4-зависимый механизм, в то время как не секреторные гранулы сливаются с фагосомами по Munc13-4-независимому механизму. Эти механизмы могут быть связаны с изменением концентрации и типов белков, содержащихся в сплавляющихся гранулах. Было сообщено, что не секреторные гранулы проявляют высокую концентрацию антибактериальных белков, 500 мг/мл в фагосомах. Некоторые азурофильные гранулы являются дефензин-бедными, и количество дефензина также варьируется. Некоторые классические мембранные белки лизосом, такие как LAMP (lysosome-associated membrane proteins) I и II, не экспрессируются на азурофильных гранулах, что противоречит мнению о том, что азурофильные гранулы являются

специализированными лизосомами, хотя LAMP III экспрессируется на азурофильных гранулах.

Вторичные и третичные гранулы играют важную роль в экстравазации и миграции нейтрофилов, и они отображают морфофункциональный континуум, а не дискретные подмножества. Существует три комбинации маркеров поверхности, которые определяют подмножества гранул. Специфическими гранулами являются лактоферрин⁺ / желатиназа⁻; гранулами желатиназы являются лактоферрин⁻ / желатиназа⁺; и "гибридные" гранулы, содержащие оба признака, являются лактоферрин⁺/желатиназа⁺. Хотя эти гранулы содержат похожие белки, они играют различную роль в процессе борьбы с инфекцией. Гранулы желатиназы, содержащие меньше антибактериальных белков, таких как лактоферрин, экзоцитозируются раньше, чем два других вида гранул, за которыми следуют гибридные гранулы, а специфические гранулы экзоцитозируются последними для уничтожения микробов. Хронология экзоцитоза гранул согласуется с функциями гранул: когда ткани поражаются патогенами, антимикробные гранулы высвобождаются после тех, которые способствуют миграции. По-видимому, Rab GTPases играет важную роль в этом процессе. Транспортировка специфических и желатиназных гранул к клеточной мембране осуществляется через Rab27-и Munc13-4-зависимый путь. Циклы Rab32 с Rab38 и регулирует эндосомальную систему торговли людьми. Было показано, что Rab32 не только связан с биогенезом связанных с лизосомами органелл, таких как меланосомы, но и с контролем внутриклеточных патогенов. Например, было показано, что Rab32 также участвует в деградации внутриклеточных Моноцито-генов листерий, заключая листерии, которые выходят из листерийсодержащих везикул в цитоплазму. Гораздо более глубокое понимание механизма защиты хозяина, опосредованного Rab32, должно быть в центре внимания как клеточной биологии, так и медицинских исследований. Дефекты гранул часто приводят к заболеваниям, например, гранулы, которые аномально кластеризованы и

поляризованы, участвуют в развитии специфического дефицита гранул (SGD). Кроме того, аномально кластеризованные гранулы также экспрессируют белки с ограниченными гликолиз-эпитопами, проявляя аномалии в функциях.

Секреторные везикулы (СВ) образуются на поздней стадии фенотипической прогрессии нейтрофилов и выполняют функцию передачи мембранных белков на поверхность клетки. Белки, упакованные в СВ, включают рецептор 1 формилового пептида (fPR1), интегрин Mac-1 (α M β 2), фагоцитарные рецепторы CD16, а также CXCR2, которые жизненно необходимы для экстравазации и миграции. Эти белки усиливают экспрессию интегринов и хемотаксических рецепторов на мембране нейтрофилов и способствуют экстравазации и функционированию нейтрофилов в воспалительных тканях [17, 18, 19].

НАДФН-оксидаза играет важную роль в контроле процесса активации нейтрофилов и фагоцитоза. Генерация большого количества активных форм кислорода (АФК; супероксид и перекись водорода) НАДФН-оксидазой через окислительный (дыхательный) взрыв является ключевым событием в процессе фагоцитоза и утилизации макромолекул.

1.2.3. Респираторный взрыв нейтрофилов

Респираторный взрыв генерирует АФК путем превращения молекулярного кислорода в супероксид многокомпонентным НАДФН-оксидазным комплексом. Оксидаза состоит из трех мембранных субъединиц (gp91 phox /NOX2, p22 phox и Rap1A) и четырех цитозольных белков (p47 phox, p67 phox , p40 phox, и Rac2). Пространственное разделение мембранного и цитозольного компонентов поддерживает ферментативную активность в покоящихся нейтрофилах. При стимуляции цитозольные компоненты транслоцируются на мембрану с образованием каталитически активного ферментного комплекса. Фосфорилирование компонентов цитозольной НАДФ-оксидазы необходимо для транслокации у этих

компонентов на плазматическую мембрану. Одной из основных мишеней фосфорилирования является субъединица P47 phox. Фосфорилирование ряда серинов (Ser 303 –Ser 379) в начале процесса активации облегчает p47 phox стыковка к мембранным и цитозольным компонентам оксидазы, приводящая к агрегации функциональной оксидазы.

Не рецепторные тирозинкиназы и митоген-активированная протеинкиназа p38 (MAPK) являются сигнальными молекулами, которые участвуют в подавлении активности респираторного взрыва с помощью TNF α . Ингибирование активности тирозинкиназы блокирует активацию P38 MAPK с помощью TNF α , указывая, что тирозинкиназы участвуют в прайминге, активируя P38 MAPK. TNF α -опосредованная активация пути P38 MAPK способствует праймингу за счет усиления транслокации плазматической мембраной цитозольных компонентов НАДФН-оксидазы и увеличения экспрессии компонентов плазматической мембраны-оксидазы. Усиленная транслокация цитозольных компонентов является результатом P38 MAPK-зависимого фосфорилирования Ser 345 на P47 phox . Фосфорилирование Ser 345 инициирует ряд конформационных изменений в P47 phox это приводит к гиперактивации НАДФН-оксидазы. Начальным событием является связывание пролильной изомеразы Pin1 с участком phospho-Ser 345. Это производит конформационное изменение в P47 phox которое подвергает действию дополнительные аминокислоты для фосфорилирования киназой протеина С (PKC). Фосфорилирование ПКК вызывает второе конформационное изменение, которое способствует связыванию P47 phox с p22 phox. Это взаимодействие приводит к транслокации и сборке всех компонентов цитозольной оксидазы с компонентами мембранной НАДФ-оксидазы. Pin1 также участвует в праймеризации с помощью GM-CSF и CL097, агониста TLR8. В отличие от TNF α , GM-CSF индуцирует фосфорилирование Ser 345 на P47 phox через активацию ERK1/2, а не P38 MAPK. Это наблюдение указывает на то, что множественные пути трансдукции сигналов индуцируют одни и те же

молекулярные события, необходимые для прайминга. Эти резервные пути передачи сигнала вряд ли могут служить эффективными терапевтическими целями [20].

Устойчивый окислительный всплеск связан с хроническими патологическими состояниями и генерирует реактивные метаболиты макромолекул в тканях и сосудистых компартментах. Это может привести к модификации клеточных белков, липидов и ДНК и может вызвать дисфункцию клеток и тканей. Мембранные липиды являются одной из основных мишеней окислительного повреждения и генерации вторичных реактивных молекул. Обширная модификация клеточных белков и ДНК может влиять на клеточный гомеостаз путем изменения клеточной сигнализации, динамики метаболического пути, потока метаболитов и синтеза АТФ, что в свою очередь может влиять на критические функции нейтрофилов, такие как клеточная подвижность, фагоцитоз и микробное убийство [21].

1.3. Метаболизм и связь с функциональной активностью

Метаболические потребности нейтрофилов были относительно упущены из виду. Вероятно, это связано с тем, что нейтрофилы имеют мало, хотя и функциональных, митохондрий и были показаны в первую очередь гликолитические. Однако энергетические потоки, которые нейтрофилы претерпевают для выполнения энергетических потребностей хемотаксиса, фагоцитоза и высвобождения нейтрофильных внеклеточных ловушек (сетей), остаются не полностью выясненными. Способность нейтрофилов убивать патогены зависит от активности НАДФН оксидазы (NOX), которая состоит из Nox2, p22-phox, p47-phox и p67-phox. Недавно в стимулированных нейтрофилах была выявлена интригующая петля активации НАДФН-оксидазы-гликолиза, поскольку активность Nox2 требовалась для стимуляции индуцированного увеличения гликолиза. Последний также зависел от фосфорилирования 6-фосфофрукто-2-киназы (PFK-2). ПФК-2 катализирует образование фруктозо-2,6-бисфосфата, который активирует фосфофрукто-1-киназу (ПФК-1), фермент, лимитирующий скорость гликолиза. Кроме того, в хемотаксисе нейтрофилов недавно были задействованы асимметричная сигнализация mTOR и OXPHOS [22].

Комплекс НАДФН-оксидазы состоит из 2 мембранно связанных субъединиц и трех цитозольных регуляторных субъединиц, все они кодируются различными генами. Субъединицы pN agocyte ox idase или phox называются по их молекулярной массе или названиям генов и собираются вместе, образуя активный комплекс, который переносит электроны NADPH-производные на свой субстрат O₂. Мембранно-ограниченный флавоцитохром b558 представляет собой гомодимер, образованный двумя интегральными мембранно-ограниченными белками, гликозилированными gp91 phox (NOX2 или CYBB) и негликозилированными субъединицами P22phox (CYBA). Gp91 phox субъединица является главным окислительно-восстановительным центром комплекса, и отвечает за электронную

трансферазную активность комплекса. Цитозольный флавинадениндинуклеотидный домен (ФАД) gp91phox получает два электрона от NADPH, которые последовательно передаются по двум внутренним гем-частицам внутри мембранного остова gp91phox core. Субъединица P22 phox является облигатным связующим партнером gp91phox и имеет важное значение для стабильности гетеродимера. Он также обеспечивает стыковочные узлы, критически важные для сборки регуляторных субъединиц оксидазы, которые транслоцируются из цитозоля. Активация ферментного комплекса тесно регулируется рядом белково-белковых и липидсвязывающих взаимодействий, которые опосредуют транслокацию цитозольных субъединиц НАДФН-оксидазы в плазму или фагосомную мембрану. Одновременные события приводят к активации Rac. Rac принадлежит к семейству Rho GTPases и является облигатным связующим партнером ферментного комплекса НАДФН-оксидазы [23, 24].

Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Г6ФД) — цитозольный фермент, входящий в пентозофосфатный путь, метаболический путь. Центральными ролями глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы являются производство рибозы и восстановление эквивалентного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) через пентозофосфатный путь (PPP). Оба продукта жизненно важны для синтеза многих биологических строительных блоков, таких как нуклеиновые и жирные кислоты. Повышение активности данного фермента в нейтрофилах отражает активацию реакций пластического обмена и увеличение наработки NADPH для NADPH-оксидазы [25, 26].

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа 1 (GPD1), НАД⁺/НАДН-зависимый фермент, присутствующий в цитозоле, катализирует обратимое превращение глицерол-3-фосфата (G3P) в дигидроксиацетонфосфат (DHAP). Г3ФДГ осуществляет образование глицеро-3-фосфата из диоксиацетонфосфата, в то время как последний генерируется в реакциях гликолиза и глюконеогенеза. В то же время, образовавшийся в реакциях липидного катаболизма, глицерол-3-

фосфат переводится на реакции анаэробного окисления глюкозы с помощью ГЗФДГ. На примере некоторых тканей доказана возможность образования комплекса ГЗФДГ с альдолазой. Причем установлено, что альдолаза связывается только с активным димером дегидрогеназы, увеличивая при этом активность фермента.

Синтезированный в цитоплазме НАДН не способен сам проникать через митохондриальную мембрану. Однако электроны НАДН способны включаться в дыхательную цепь с помощью α -глицерофосфатного водородного шунта. Цитоплазматический НАДН сначала реагирует с диоксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется НАД-зависимой цитоплазматической ГЗФДГ. Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная ФАД-зависимая) ГЗФДГ окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата. ФАДН₂ вводит приобретенные им электроны на уровне коэнзима Q в систему дыхательной цепи, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму, где снова взаимодействует с НАД-зависимой ГЗФДГ.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) фермент гликолитического цикла, обратимо катализирующий окисление лактата в пировиноградную кислоту с участием в качестве кофермента НАД. В варьирующих количествах ЛДГ содержится во всех органах и тканях организма; наибольшая ее активность отмечается в гладкой и поперечнополосатой мускулатуре, печени, почках и форменных элементах крови. Установлено существование 5 изоферментов ЛДГ, различающихся по сочетанию составляющих ее полипептидных цепей; для разделения изоферментов обычно пользуются электрофорезом на ацетатцеллюлозных пленках. Каждый изофермент представляет собой тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов. За их синтез отвечают разные гены, уровень активности которых различен в разных тканях. Именно за счет изоферментного спектра и

осуществляется контроль за интенсивностью субстратного потока по гликолизу. В тканях с аэробным метаболизмом преобладают изоферменты ЛДГ, которые чувствительны к пирувату. Данные изоферменты ЛДГ ингибируются даже небольшим количеством пирувата, что препятствует образованию лактата и приводит к более полному окислению пирувата через образование ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот. В тканях с преимущественно анаэробным дыханием выявляется изоферментный спектр ЛДГ, который не ингибируется пируватом (во всяком случае, в низких концентрациях). ЛДГ занимает ключевое положение в регуляции цитоплазматического уровня НАДН/НАД. В случае избытка НАДН в цитоплазме ЛДГ восстанавливает пируват до лактата, который затем удаляется из клетки (анаэробная реакция ЛДГ). В то же время, при активации аэробных процессов ЛДГ может окислять лактат до пирувата с образованием НАДН (аэробная реакция ЛДГ). В этом случае пируват, образовавшийся при окислении лактата, в основном через пируватдегидрогеназный комплекс поступает на реакции цикла трикарбоновых кислот (митохондриальный компартмент).

Малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) – фермент, катализирующий обратимое окисление малата в оксалоацетат. Фермент локализуется как в митохондриях (цикл трикарбоновых кислот), так и в цитоплазме. В митохондриях уровень соотношения НАДН/НАД относительно велик, в результате чего внутримитохондриальным оксалоацетат легко восстанавливается в малат, который легко выходит из митохондрий. В цитоплазме уровень отношения НАДН/НАД мал, что приводит к окислению малата при участии цитоплазматической НАД-зависимой МДГ.

МДГ принимает участие в реакциях азотного обмена. Одним из ключевых интермедиатов азотного обмена является аспарат, который синтезируется в результате трех сопряженных реакций. В ходе первой реакции фумарат под действием фумаразы присоединяет воду и

превращается в малат. Во второй реакции малат под действием МДГ окисляется до оксалоацетата, который в третьей реакции – в реакции трансаминирования с глутаматом преобразуется в аспартат. Кроме того, МДГ принимает самое активное участие в работе малат-аспартатного водородного шунта митохондрий.

Данная система функционирует благодаря наличию МДГ и аспартатаминотрансферазы как в цитоплазме, так и в митохондриях. Водородный шунт работает следующим образом. Сначала водород от синтезированного в цитоплазме НАДН переносится на цитоплазматический оксалоацетат. В результате образуется малат, который с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрий в матрикс. В матриксе митохондрий с помощью МДГ малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный НАД⁺ восстанавливается до НАДН, который может передавать свои электроны в дыхательную цепь, локализованную на внутренней мембране митохондрий. В свою очередь, образовавшийся оксалоацетат в присутствии глутамата и аспартатаминотрансферазы вступает в реакцию трансаминирования. Образовавшиеся в результате данной реакции α -кетоглутарат и аспартат с помощью специальных транспортных систем способны проходить через мембрану митохондрий.

В митохондриях существует два типа изоцитратдегидрогеназ. НАД⁻зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДИЦДГ, КФ 1.1.1.41) выявляется только в митохондриальном компартменте, в то время как НАДФ⁻зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФИЦДГ, КФ 1.1.1.42) выявляется как в митохондриях, так и в цитоплазме. НАДИЦДГ осуществляет третью реакцию в цикле трикарбоновых кислот, которая, по-видимому, является лимитирующей. В ходе изоцитратдегидрогеназной реакции также осуществляется декарбоксилирование изолимонной кислоты. Специфическим активатором НАДИЦДГ является АДФ, ингибиторами

фермента являются АТФ и НАДН. Кроме того, изоцитратдегидрогеназе для осуществления ферментативной активности необходимы ионы магния и марганца.

Глутаматдегидрогеназа осуществляет окислительное дезаминирование L-глутаминовой кислоты. В качестве кофермента глутаматдегидрогеназа использует НАД (НАДГДГ, КФ 1.4.1.2) или НАДФ (НАДФГДГ, КФ1.4.1.4). Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием промежуточного продукта – иминоглутаровой кислоты, после чего осуществляется спонтанный гидролиз с образованием аммиака и α -кетоглутаровой кислоты.

Ферментативные реакции глутаматдегидрогеназ являются обратимыми, соответственно аммиак в присутствии НАД(Ф)Н и α -кетоглутаровой кислоты может участвовать в синтезе глутамата. Глутаматдегидрогеназа представляет собой один из наиболее изученных ферментов азотистого метаболизма. Глутаматдегидрогеназа является олиго-мерным ферментом с молекулярной массой 312000, который состоит из 6 субъединиц. Фермент проявляет свою активность только в мультимерной форме. При диссоциации глутаматдегидрогеназы на субъединицы, которая происходит в присутствии НАДН, ГТФ и ряда стероидных гормонов, фермент теряет способность осуществлять окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, но приобретает способность осуществлять дезаминирование ряда других аминокислот. Подобная особенность характеризует аллостерический механизм регуляции глутаматдегидрогеназы и определяет данный фермент как регуляторный в системе аминокислотного обмена.

Таким образом, НАД(Ф)- и ФАД-зависимые дегидрогеназы находятся на ключевых позициях внутриклеточного метаболизма. Представленные дегидрогеназы локализируются в различных компартментах клетки и вовлечены в функционирование разных метаболонов. Их активность определяет как ряд основных пластических процессов (синтез аминокислот,

нуклеотидов, липидов и т.д.), так анаэробные и аэробные дыхательные реакции [27].

Глутатионовая система – один из главных компонентов антиоксидантной защиты организма от эндогенно и экзогенно индуцированного образования перекисей липидов. Глутатионредуктаза (ГР) – зависимый от никотинамид-адениндинуклеотид фосфата восстановленного (НАДФН), фермент, который обладает дисульфидредуктазной активностью и увеличивает содержание редуцированной формы глутатиона в клетках. Уровень активности ГР, является одним из критериев оценки адаптивных возможностей организма [28].

2. Методика

2.1. Объект исследования

На базе Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи имени Н.С.Карповича обследовано 86 пациентов. Из них 67 человек составляют контрольную группу и 19 больных с панкреонекрозом.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной 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

Забор крови для иммунологического исследования проводили утром натощак с 8 до 9 часов. Выделение общей фракции лимфоцитов и нейтрофилов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина. В стеклянную пробирку для центрифуги отмеряется 2 мл фикола, плотностью 1,119. Затем наслаивается 2 мл фикола с плотностью 1,077. Поверх наслаивается 6-6,5 мл крови. Центрифугируется 40мин на 1500 оборотах. Получаем расслоение по фракциям: плазма, моноцитарно-лейкоцитарное кольцо, фикол, нейтрофильное кольцо, эритроциты. Механической пипеткой отбираем нейтрофильное кольцо в пробирку с 5 мл физиологического раствора. Надосадочную жидкость слить, добавить 1 мл Хэнкса («ПанЭко», Россия). Подсчёт лейкоцитов производится в Камере Горяева. В зависимости от результатов производится разведение до концентрации 1 млн. клеток на 1 мл раствора.

2.3. Определение хемилюминесцентной активности нейтрофилов периферической крови

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 200 мкл взвеси нейтрофилов (1 млн/мл), 50 мкл люминола или люцигенина (“Sigma”, США) в концентрации 10-5 М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 240 мкл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL3606” (СКТБ “Наука”, Красноярск). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной (Синд./ Спонт.) и определяли как индекс активации.

Результаты ХЛ анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности ХЛ, значение максимума интенсивности ХЛ, площадь под кривой ХЛ. Определили индекс чувствительности хемилюминесценции (ИА)- отношением площади кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном к спонтанной хемилюминесценции. Индекс активации определяли по формуле:

$$\text{ИА} = \text{Синдуцированная} / \text{Спонтанной},$$

Синдуцированная – величина площади под кривой хемилюминесценции индуцированной зимозаном (относительных единиц).

Спонтанная – величина площади под кривой хемилюминесценции не индуцированная (относительных единиц).

2.4. Определение биолюминесцентной активности

Биолюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводили по ранее разработанным методикам [Савченко 1989]. Данным методом определялась активность Г6ФДГ, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (НАДФМДГ), НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ), НАД-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ), НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ), НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФИЦДГ), ГР.

Суспензию выделенных нейтрофилов, содержащую клетки количеством 1,0 млн/мл, разрушали путем заморозки–разморозки осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. В 150мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии разрушенных нейтрофилов. Значение концентраций субстратов и кофакторов, а также рН, для определяемых ферментов представлены в табл. 1.

Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

Таблица 1 – Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах биolumинесцентным методом.

Фермент	Субстрат – мМ	Кофактор – мМ	рН буфера
Г6ФДГ	Г6Ф – 1,5	НАДФ – 0,025	9,8
Г3ФДГ	Г3Ф – 0,5	НАД – 0,35	9,8
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДФМДГ	Малат – 7,5	НАДФ – 0,375	9,8
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8
НАДИЦДГ	Изоцитрат – 5,0	НАД – 5,0	7,8
НАДФИЦДГ	Изоцитрат – 1,375	НАДФ – 0,075	7,4
НАДНЛДГ	Пируват – 0,25	НАДН – 0,005	7,0
НАДНМДГ	Оксалоацетат – 0,5	НАДН – 0,005	7,0
ГР	GSH – 0,5	НАДФН – 0,0025	7,4
НАДФНГДГ	Оксоглутарат – 100	НАДФН – 0,0025	7,4

НАДНГДГ	Оксоглутарат –	НАДН –	7,0
	100	0,0025	

Примечание: среды с рН 9,0 и 9,8 готовили на Трис-НСI буфере; с рН 7,0, 7,4 и 7,8 – на K^+ , Na^+ -фосфатном буфере.

После инкубации при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)) или 5 минут (для реакции с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5} M$, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:ФМН оксидоредуктаза- люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатном буфере с рН 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы определение активности ферментов проводится с помощью биолюминометра «CL3606М» (СКТБ “Наука”, Красноярск). Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМН оксидоредуктаза- люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibriofischeri* в Институте биофизики СО РАН г. Красноярска (Тюлькова Н.А., Антонова Э.В., 1991).

2.5. Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 2010 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакета прикладных программ и Statistica 8,0 производился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C25 и C75). Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивали по непараметрическому критерию Mann-Whitney. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Результаты статистической обработки сведены в таблицах и использованы в рисунках.

3. Результаты исследования и их обсуждение

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

Заключение

В настоящее время нейтрофилы при аутоиммунных заболеваниях не имеют четкой классификации. В большинстве случаев они проявляют провоспалительный фенотип и способствуют патогенезу заболевания через многочисленные механизмы (секреция воспалительных молекул, активация других иммунных клеток, облегчение продукции аутоантител).

Нейтрофилы уже давно признаны профессиональными киллерами. Их главной задачей считалось уничтожение бактерий и грибков. Однако накапливаются данные о том, что нейтрофилы, помимо своей прямой антимикробной функции, участвуют в последующей модуляции (адаптивных) иммунных реакций при тяжелом воспалении [11].

В нашем анализе показано:

- У больных с панкреонекрозом при спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов повышение показателей времени выхода кривой на максимум интенсивности, максимальное значение интенсивности и площадь под кривой по сравнению с контролем. При зимозан индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов было зафиксировано повышение показателей площади под кривой и максимального значения интенсивности у больных с панкреонекрозом.
- При спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов изменения были зафиксированы только у показателя площади под кривой у больных с панкреонекрозом повышение относительно контрольной группы;
- Оценка метаболизма показала изменения активности таких ферментов, как НАДФН-зависимой ГДГ и лактатдегидрогеназы.

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИА – индекс активации

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МДСК – миелоидные супрессорные клетки

МПО – миелопероксидаза

НГ – нейтрофильные гранулоциты.

ОП – острый панкреатит.

ПМН – полиморфноядерные нейтрофилы

СВ – секреторные везикулы

ХЛ – хемилюминесценция

Список литературы

1. Винник, Ю.С. Диагностическая роль интегральных гематологических показателей и хемилюминесценции нейтрофилов при тяжелом остром панкреатите / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфьева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – № 10. – С. 86-90.
2. Yalçın, M.S. New predictor of acute necrotizing pancreatitis: Red cell distribution width / Mehmet Suat Yalçın, Adnan Tas, Banu Kara, Sehmus Olmez, Bunyamin Saritas // The American Journal of Emergency Medicine. – 2018. – V. 27. – I. 2. – P. 225-228.
3. Ошуркова, Е.Ф. Панкреонекроз и его хирургическое лечение / Е.Ф. Ошуркова, Е.С. Рудова, Н.С. Суслов // Международный студенческий научный вестник. – 2019. – № 3.
4. Boumitri, C. Necrotizing Pancreatitis: Current Management and Therapies / Christine Boumitri, Elizabeth Brown, Michel Kahaleh // Clinical Endoscopy. – 2017. – I. 50. – P. 357-365.
5. Черватюк, М.И. Острый панкреатит: этиология, патогенез, диагностика, лечение / М.И. Черватюк, М.М. Амичба // Аллея науки. – 2018. – Т. 4. – № 11. – С. 521-524.
6. Савельев, В.С. Панкреонекрозы / В.С. Савельев, М.И. Филимонов, С.З. Бурневич // М.: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2008. – 264.: ил
7. Fournier, B.M. The role of neutrophils during intestinal inflammation / B.M. Fournier, C.A. Parkos // Mucosal Immunol. – 2012. – I. 5 – P. 354–66.
8. Yang, Zhi-wen Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis / Zhi-wen Yang, Xiao-xiao Meng, Ping Xu // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2015. – V. 19. – I. 11. – P. 2513-2520.
9. Kuhns, D.B. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils / Douglas B. Kuhns, Debra A. Long Priel, Jessica Chu, Kol A. Zarembek // Curr Protoc Immunol. – 2016. – № 2. – P. 1-18.

10. Ярилин, А.А. Иммунология / А. А. Ярилин // Учебник – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 752 с.: ил.
11. Pieter H.C. Leliefeld, The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation / Pieter H. C. Leliefeld¹, Catharina M. Wessels¹, Luke P. H. Leenen, Leo Koenderman and Janesh Pillay // Leliefeld et al. Critical Care. – 2016. – V. 20. – I. 73. – P. 1-9.
12. Wang, Xu Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases / Xu Wang, Lin Qiu, Ziyi Li, Xiang-Yang Wang and Huanfa Yi // Frontiers in Immunology. – 2018. – V. 9. – A.2456. – P. 1-10.
13. Rashidfarrokhi, A. Visualizing the Early Stages of Phagocytosis / Ali Rashidfarrokhi, Veronica Richina, Fikadu G. Tafesse // Journal of Visualized Experiments. – 2017. – № 120. – P. 1-9.
14. Angelo A. Manfredi, The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps / Angelo A. Manfredi, Giuseppe A. Ramirez, Patrizia Rovere-Querini, Norma Mauger // Frontiers in Immunology. – 2018. – V. 9. – A.288. – P. 1-13.
15. Sorensen, O.E. Neutrophil extracellular traps – the dark side of neutrophils/ O.E. Sorensen, N. Borregaard // J Clin Invest. – 2016. – V. 126. – A. 5.
16. Mayadas, T.N. The Multifaceted Functions of Neutrophils / T. N. Mayadas, Xavier Cullere, Clifford A. Lowell // Annual Reviews. – 2014. – I.9. – P. 181-218.
17. Peiqing, Y. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function / Peiqing Yang , Yanhong Li, Yan Xie, Yi Liu // Journal of Immunology Research. – 2019. – P. 1-18.
18. Zhang, D. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome/ D. Zhang, G. Chen, D. Manwani [et al] // Nature. – 2015. – V. 525. – P. 528–532.
19. Yin, C. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules / C. Yin, B. Heit // Cell and Tissue Research. – 2018. – V. 371. – No. 3. – P. 455–471.

20. Miralda, I. Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming / Irina Miralda, Silvia M. Uriarte, Kenneth R. McLeish // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – V. 7. – A.217. – P. 1-13
21. Chacko, Balu K. Pleiotropic effects of 4-hydroxynonenal on oxidative burst and phagocytosis in neutrophils / Balu K. Chacko, Stephanie B. Wall, Philip A. Kramer, Saranya Ravi, Tanecia Mitchell, Michelle S. Johnson and et.c. // *Redox Biology*. – 2016. – I. 9. – P. 57-66.
22. Lightfoot, Yaima L. Metabolic Abnormalities and Oxidative Stress in Lupus / Yaima L. Lightfoot, Luz P. Blanco, Mariana J. Kaplan // *Curr Opin Rheumatol*. – 2017. – V. 29 – I. 5. – P. 442-449.
23. Magnani, F. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase / Francesca Magnani, Simone Nenci, Elisa Millana Fananas, Marta Ceccon, Elvira Romero, Marco W. Fraaije, and Andrea -Mattevia // *Proc Natl Acad Sci*. – 2017. – I26. – P. 6764-6769.
24. Zeng, Melody Y. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses / Melody Y. Zeng, I. Miralda, Courtney L. Armstrong, Silvia M. Uriarte and Juhi Bagaitkar // *Mol Oral Microbiol*. – 2019. – I 2. – P. 27-38.
25. Yang, Hung-Chi The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death and Cancer / Hung-Chi Yang, Yi-Hsuan Wu, Wei-Chen Yen, Hui-Ya Liu, Tsong-Long Hwang, Arnold Stern, Daniel Tsun-Yee Chiu // *Cells*. – 2019. – V. 8. – A. 1055. – P. 1-29.
26. Савченко, А.А. Зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их метаболизма у больных с разной степенью тяжести острого деструктивного панкреатита / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий, А.Ю. Медведев, И.И. Гвоздев // *Медицинская иммунология*. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 77-88.
27. Савченко, А.А. Основы клинической иммунометабомики / А.А. Савченко, А.Г. Борисов // Новосибирск: Наука. – 2012. – С. 263.

- 28.Парахонский, А.П. Анализ активности глутатионредуктазы в крови больных язвенной болезнью / А.П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 2. – С. 86-87.
- 29.Winterbourn, C.C. Reactive oxygen species and neutrophil function/ Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. // Annu. Rev. Biochem. – 2016. – Vol. 85. – P. 765-792.
- 30.Савченко, А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом / А.А. Савченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159. – № 5. – С. 656-660.
- 31.Гринштейн, И.Ю. Особенности респираторного взрыва и метаболизма нейтрофилов крови у больных с разной чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте при остром коронарном синдроме / И.Ю. Гринштейн, А.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн, И.И. ГВОЗДЕВ, М.М. ПЕТРОВА // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 4. – С. 61-65.
- 32.Han, C.Y. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes/ Han C.Y., Umemoto T., Omer M. [et al.] // J. Biol. Chem. 2012 – V. 287 – No. 13. – P. 10379–10393.
- 33.Расщепкина, Н.И. Дегидрогеназная активность нейтрофилов крови у часто болеющих детей / Н. И. Расщепкина, В. И. Григанов // Молодой ученый. — 2011. — Т. 2.— № 7. — С. 131-132.
- 34.Савченко, А.А. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, И.И. Гвоздев, А.В. Мошев, Д.В. Черданцев, О.В. Первова // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7. – № 3. – С. 259-270.
- 35.Borekci, A. Oxidative stress and spontaneous reperfusion of infarct-related artery in patients with ST-segment elevation myocardial infarction / Borekci

A., Gur M., Turkoglu C. // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2016. – № 22. – P. 171.

