

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ  
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Кратасюк В.А.  
\_\_\_\_\_ подпись      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

Активность свободных радикалов кислорода у больных описторхозом

Руководитель	_____	_____	_____
	подпись, дата	должность, ученая степень	Коленчукова О.А. инициалы, фамилия
Выпускник	_____		_____
	подпись, дата		Чуяшенко Д.Е. инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Активность свободных радикалов кислорода у больных описторхозом» содержит 30 страниц текстового документа, 5 иллюстраций, 4 таблицы, 25 использованных источников.

Всего было обследовано 60 больных описторхозом и 30 практически здоровых пациента в возрасте от 24 до 60 лет. Настоящее исследование было выполнено на базе НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН и гастроэнтерологического отделения ЧУЗ Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск.

**Цель** - исследовать функциональную активность фагоцитов крови у больных описторхозом.

Хемилюминесцентный анализ применялся для изучения интенсивности выработки активных форм кислорода (АФК) в культуре моноцитов и нейтрофильных гранулоцитах крови, в том числе в ответ на внешний стимул (зимозан). Из показателей перекисного окисления липидов было исследовано содержание малонового диальдегида(МДА). Для изучения антиоксидантной системы будет определялась активность супероксиддисмутазы(СОД) и каталазы(САТ).

**Результаты.** В культурах моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов наблюдается снижение показателей хемилюминесцентного анализа, как при определении всего пула активных форм кислорода(АФК) в люминол-зависимом процессе (в спонтанной и индуцированной внешним стимулом(зимозаном) реакциях), так и в люцигенин-зависимой реакции (в спонтанной и индуцированной внешним стимулом(зимозаном) реакциях). Исследование антиоксидантной системы показало повышение активности фермента Каталазы(САТ) у больных описторхозом относительно контроля.

## Содержание

РЕФЕРАТ.....	2
Содержание .....	3
Введение .....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1 Описторхоз .....	7
1.1.2 Биологические особенности возбудителей описторхоза .....	7
1.1.3 Патогенез описторхоза.....	8
1.2 Оксидативный стресс.....	9
NADPH-оксидаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ .....	11
1.5 Антиоксиданты .....	11
1.5.1 Супероксиддисмутаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....	11
1.5.2 Каталаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ .....	12
1.6 Фагоцитоз. Фагоцитарные клетки периферической крови.....	13
1.6.1 Характеристика и функции нейтрофильных гранулоцитов .....	14
1.7.2 Характеристика и функции моноцитов .....	15
2 Объекты и методы исследования .....	17
2.1 Объекты исследования .....	17
2.2 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови.....	17
2.3 Методы исследования.....	18
2.4 Статистические методы исследования.....	20

3	Выводы .....	27
4	Список литературы .....	28

## Введение

Проблема описторхоза в настоящий момент существенно накапливает силы и не перестает обретать глобальные черты. Описторхоз главным образом мобилизует свои силы в бассейнах рек Обь и Иртыш в Западной Сибири. Эта область охватывает 14 регионов Российской Федерации и четыре региона Казахстана, потенциально способна коснуться общую численность населения примерно в 15 миллионов человек. Так же известно, что в странах Центральной и Юго-Восточной Азии насчитывается около 45 миллионов человек, пораженных данным гельминтозом. Следует отметить, что международное агентство по исследованию рака (IARC) отнесло возбудителей описторхоза к первой группе канцерогенов.

Описторхоз – паразитарное заболевание, возбудителями которого являются гельминты *Opisthorchis felinus* и *Opisthorchis viverrini*. Механизм развития описторхоза включает в себя два аспекта: реакция иммунной системы человека на чужеродный агент; механическое и токсическое повреждение органов и тканей паразитом.

При воспалительном процессе формируется неспецифический иммунный ответ, проявляющийся активацией фагоцитов и являющийся важной составляющей иммунитета. Исследование состояния фагоцитарного иммунитета является актуальным направлением в диагностике.

Фагоциты, при воспалении и стрессе, начинают генерировать активные формы кислорода (АФК). На определении активности генерации АФК основан хемилюминесцентный анализ.

Исходя из этого, объектами исследования послужили нейтрофильные гранулоциты и моноциты, выделенные из периферической крови больных описторхозом.

**Цель** - исследовать функциональную активность фагоцитов крови у больных описторхозом.

### **Задачи:**

Исследовать люминол-зависимую активность нейтрофилов и моноцитов крови у больных описторхозом

Исследовать люцегенин-зависимую активность нейтрофилов и моноцитов крови у больных описторхозом

Определить показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в рамках иммуноферментного анализа

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Описторхоз

### 1.1.2 Биологические особенности возбудителей описторхоза

Возбудители описторхоза *Opisthorchis felineus* (кошачья или сибирская двуустка) и *Opisthorchis viverrini* (виверровая двуустка или юго-восточноазиатский печеночный сосальщик) относятся к классу Trematoda, семейству Opisthorchiidae, которое включает более 20 видов, паразитирующих на человеке и животных.

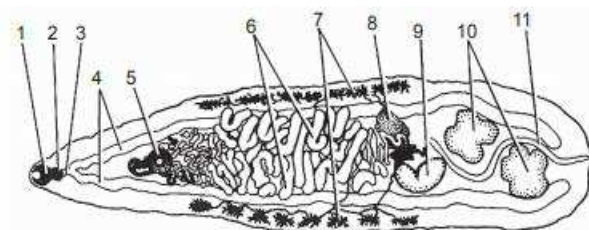


Рисунок. 1. **Строение взрослой особи *O. felineus*.** 1 – ротовая присоска; 2 – глотка; 3 – пищевод; 4 – кишечник; 5 – брюшная присоска; 6 – матка; 7 – желточники; 8 – яичник; 9 – семяприемник; 10 – семенники; 11 – экскреторный канал.

Жизненный цикл *O. felineus* включает пять личиночных стадий, протекающих в организмах трех хозяев (двух промежуточных и одного окончательного). Все стадии жизненного цикла паразита проходят со значительными морфологическими преобразованиями личинок [1].

Первая репродуктивная стадия описторхисов протекает по типу самооплодотворения в организме окончательного (дефинитивного) хозяина, которым являются представители всех основных классов позвоночных. Оплодотворенные взрослые особи описторхисов (мариты) выделяют в сутки около 900 яиц, в каждом из которых находится сформировавшаяся личинка – мирацидий, не способная заразить дефинитивных хозяев без прохождения последующих стадий жизненного цикла *O. Felineus*.

Яйца описторхисов выделяются во внешнюю среду с фекальными массами и, попадая в пресноводные водоемы весной, могут сохранять жизнеспособность более трех месяцев. Если же инкапсулированные эмбрионы оказываются в реках и озерах в период осенних осадков, то в таком случае они переживают цикл оттаивания–заморозки и сохраняют способность к заражению и в летний период [1,2].

### **1.1.3 Патогенез описторхоза**

В патогенезе описторхоза выделяют два основных аспекта: первый – это реакция иммунной системы человека на чужеродный объект, второй – механическое и токсико-аллергическое повреждение органов и тканей паразитом.

Ранняя фаза заболевания, обычно составляющая 4–8 недель, начинается, как только метацеркарии попадают в гепатобиллиарную систему человека и/или в протоки поджелудочной железы. В патогенезе этой стадии описторхоза ведущая роль принадлежит аллергическим реакциям на антигены гельминта, которыми являются ферменты и метаболиты, выделяемые личинками описторхиса в период развития. Естественной реакцией иммунной системы на поступление этих антигенов в организм человека является синтез специфических иммуноглобулинов класса М (IgM), а через 2–3 недели – иммуноглобулинов класса G (IgG). При последующем поступлении антигенов описторхисов образуются их комплексы с IgE и выделяются высокоактивные медиаторы аллергии, воздействие которых приводит к нарушению функций различных органов и систем организма больного [3,4].

Кроме того, для описторхоза характерно развитие аллергических реакций замедленного типа. Антигены описторхисов сенсibiliзируют Т-лимфоциты, которые при последующем взаимодействии с антигенами повреждаются, нарушая активность иммунного ответа.



Таким образом, формирование иммунитета к возбудителю описторхоза у больных часто сопровождается иммунопатологическими реакциями, приводящими к цитотоксической дистрофии клеток, тканей и органов.

В более позднюю стадию описторхоза ведущую роль в патогенезе заболевания играют механическое и токсическое поражение органов и тканей человека.

Мариты описторхисов в процессе своей жизнедеятельности повреждают стенки протоков гепатобилиарной системы и поджелудочной железы, отрывая эпителий, которым они питаются. В местах повреждений возникают множественные кровотокающие микроэрозии. В результате эволюционного развития этот гельминт приобрел способность стимулировать регенерацию и гиперплазию эпителия хозяина, направленную на создание оптимальных условий для своего питания и поддержания вида.

Следует также отметить, что токсичные продукты метаболизма описторхисов попадают в кровеносное русло и, распространяясь, могут оказывать негативное влияние на различные органы и ткани зараженного человека [3,4,5].

## **1.2 Оксидативный стресс**

Окислительный стресс определяется как дисбаланс между выработкой окислителей (свободных радикалов или активных форм кислорода) и их эрадикацией защитными механизмами, такими как антиоксиданты. Продуктами перекисного окисления липидов (ПОЛ) может быть целый ряд веществ. Многие из них отличаются высокой токсичностью и могут нарушить естественные процессы метаболизма. Повышенный окислительный стресс является результатом усиленной продукции АФК или сниженной способности поглощать АФК, что приводит к повреждению тканей. На самом деле повышенный окислительный стресс приводит к ряду заболеваний, включая диабетические, сосудистые и нервные расстройства, большое влияние оказывает оксидативный стресс [6].

При диабете хроническая гипергликемия и последующее увеличение активных форм кислорода (АФК) ухудшаются  $\beta$ -функция клеток и повышение инсулинорезистентности, что приводит к обострению сахарного диабета 2 типа. Кроме того, хроническая гипергликемия и АФК также участвуют в развитии атеросклероза, который часто наблюдается при диабете. Вместе взятые, вполне вероятно, что АФК играют важную роль в развитии диабета 2 типа и атеросклероза [7,8].

Оксидативный стресс тесно связан с патофизиологией нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА). Хотя его влияние на характерную нейродегенерацию БА огромно, наиболее важным аспектом является то, что окислительный стресс на самом деле является первичным предком заболевания, а не просто эпифеноменом. Более того, данные свидетельствуют о том, что длительный “период покоя” постепенного накопления окислительных повреждений предшествует и фактически приводит к кажущемуся внезапным появлению клинических и патологических симптомов БА, включая отложение амилоида- $\beta$ , образование нейрофибриллярных клубков, метаболическую дисфункцию и снижение когнитивных способностей.

Так же известно, о воздействии оксидативного стресса в процессах старения. Старение, в значительной мере, уже давно определяется как результат окислительного стресса, действующего на клетки. Клеточный механизм в конечном итоге выходит из строя на базовом уровне из-за повреждения в результате процессов окисления, и система начинает замедляться из-за внутренней эрозии [9,10].

Малоновый диальдегид (МДА) является одним из наиболее стабильных вторичных продуктов перекисного окисления липидов; он вызывает токсический стресс в клетках, образует аддукты с нуклеиновыми кислотами, что может привести к повреждению тканей, и проявляет генотоксическую активность, влияющую на развитие дегенеративных заболеваний. Накопление отражает степень окислительного стресса в организме. Оценка этого показателя необходима для определения причин и механизмов того или иного

патологического процесса, а также для того, чтобы предложить способы лечения заболеваний[11].

## **NADPH-оксидаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

НАДФН-оксидаза локализована на плазматической мембране и специфических гранулах нейтрофилов, а также может локализоваться на мембране фагоцитарной вакуоли при поглощении микробов. В этом месте она образует канал для перекачки электронов от NADPH в цитозоле к кислороду в вакуоли. NADPH-оксидаза в активном состоянии переносит электроны от NADPH в цитоплазме через мембрану к молекулярному кислороду. Затем кислород подвергается одноэлектронному восстановлению, что приводит к образованию супероксид-анион-радикала [12].

### **1.5 Антиоксиданты**

Чтобы противостоять разрушительному действию активных форм кислорода(АФК), аэробные организмы разработали защитные механизмы, которые включают в себя антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза (СОД), пероксиредоксины (PRDXs) и глутатионпероксидаза (GPXs). Антиоксиданты - это соединения, которые помогают уменьшить окислительный стресс. Они могут быть эндогенными (восстановленный глутатион и антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и редуктаза) или экзогенными (антиоксидантные витамины, такие как витамины А, С и Е). Оба типа антиоксидантов могут помочь предотвратить образование свободных радикалов, уничтожая или способствуя их распаду. Кроме того, они могут превращать реактивные метаболиты в менее реактивные молекулы[7,8,9].

#### **1.5.1 Супероксиддисмутаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Супероксиддисмутаза(СОД) – член семейства металлоферментов, экспрессируемый различными прокариотическими и эукариотическими

организмами. Избыточное образование супероксидных радикалов и других реактивных форм кислорода (АФК) может вызвать прямое повреждение нуклеиновых кислот, липидов и белков. СОД является первой линией защиты от ROSs и играет ключевую роль в защите организмов от окислительного повреждения. Она выполняет эту жизненно важную функцию, катализируя расщепление супероксидного радикала до перекиси водорода и молекулярного кислорода. Впоследствии перекись водорода метаболизируется до кислорода и воды каталазой, пероксидазами и другими утилизаторами. Более того, исследователи также обнаружили, что СОД могут реагировать на стрессы окружающей среды и вносить вклад в поддержание гомеостаза.

В соответствии с ионами металлов, расположенными на активном сайте ферментов, СОД можно разделить на четыре типа: железосодержащие СОД (Fe СОД), марганецсодержащие СОД (Mn СОД), медь-цинк-содержащие СОД и никель-содержащие СОД (Ni СОД). Медь-цинк-содержащие СОД являются наиболее распространенной формой, которая может быть далее классифицирована на два типа в соответствии с их местоположением, включая цитозольные и внеклеточные [13,14].

### **1.5.2 Каталаза: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Каталаза, ключевой фермент в системе антиоксидантной защиты организмов, поглощает свободные радикалы, чтобы сократить их вредное воздействие на хозяина, поддерживая надлежащую иммунную функцию. Каталаза, разлагает пероксид водорода на воду и молекулярный кислород, а также окисляет в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты. Пероксиредоксины и глутатионпероксидаза отвечают за деградацию пероксида водорода при низких концентрациях, в то время как каталаза участвует в удалении высоких концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Примечательно также, что каталаза, как фермент, может каталитически уничтожать пероксинитрит, сильный окислительный и нитрующий агент, который участвует во многих

патологических процессах. Кроме того, каталаза противодействует образованию пероксинитрита путем окисления в присутствии перекиси водорода оксида азота в нитрит. В целом, эти каталитические свойства еще больше усиливают опосредованную каталазой систему антиоксидантной защиты клеток [15,16].

В дополнение к их основной функции поглощения активных форм кислорода (АФК), имеются данные об участии каталаз в иммунной сигнализации. Стимуляция врожденного иммунного ответа была отмечена у круглых червей, а участие каталаз в противомикробной защите хозяина было отмечено у плодовых мушек. Кроме того, исследования каталаз ракообразных и моллюсков показали их активность и измененную экспрессию во время бактериальных и вирусных инфекций [17].

### **1.6 Фагоцитоз. Фагоцитарные клетки периферической крови**

Фагоцитоз является важным процессом для тканевого баланса, и многие типы клеток могут выполнять этот процесс. Однако только специализированные клетки, называемые фагоцитами, выполняют этот процесс с высокой эффективностью. Дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы являются одними из таких клеток. Эти клетки экспрессируют несколько рецепторов, которые активируют сигналы внутри клеток, приводящие к фагоцитозу [18].

Фагоцитированные бактерии, попавшие в фаголизосомы макрофагов и нейтрофилов, убиваются кислородно-независимыми или –зависимыми (респираторный взрыв) механизмами. В нейтрофилах кислородно-независимые механизмы уничтожения и переваривания микробов включают протеолитические ферменты, высвобождающиеся при слиянии первичных (или азурофильных) или вторичных (или специфических) цитоплазматических секреторных гранул с лизосомой, и некоторые утверждают, что протеазы, активируемые потоком калия в эндоцитарную вакуоль, являются основными агентами уничтожения бактерий.

При воздействии определенных стимулов фагоциты (включая нейтрофилы, макрофаги и эозинофилы) претерпевают заметные изменения в том, как они

обрабатывают кислород. Во-первых, скорость поглощения кислорода значительно возрастает. Это сопровождается выработкой большого количества супероксида и перекиси водорода и метаболизмом большого количества глюкозы через гексозомонофосфатный шунт. Кислород используется не для дыхания, а для производства мощных микробиоцидных агентов после первоначального производства супероксида. Одновременно с этим глюкоза окисляется через гексозомонофосфатный шунт для повторного получения NADPH, который был израсходован при восстановлении молекулярного кислорода для образования супероксида [19,20].

Макрофаги - это иммунные клетки, которые участвуют как во врожденных, так и в адаптивных иммунных реакциях. Они мигрируют, чтобы достичь инфекционных участков и поглощают микроорганизмы, мусор и инородные тела - этот процесс называется фагоцитозом. Как миграция, так и фагоцитоз зависят от сильной и скоординированной реорганизации актинового цитоскелета [23].

### **1.6.1 Характеристика и функции нейтрофильных гранулоцитов**

Долгое время нейтрофильные гранулоциты или полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН) широко рассматривались как грубые и агрессивные киллеры врожденной иммунной системы, менее сложные, чем моноциты, макрофаги или Т-клетки. На самом деле, нейтрофильные гранулоциты, выполняя функцию первой защитной волны, являются первой клеточной популяцией, которая прибывает в место микробной инвазии с задачей устранить нарушителей. Для этого ПМН оснащены внушительными и разнообразными арсеналами биологического оружия. К ним относятся активные формы кислорода протеазные пузырьки, антибактериальные биомолекулы и способность высвободить сетчатый хроматин в виде так называемых нейтрофильных внеклеточных ловушек (сетей) для захвата внеклеточных патогенов.

Нейтрофил является одним из основных клеточных медиаторов организма по уничтожению микроорганизмов и неизбежно повреждает клетки и ткани

хозяина. Опосредованное нейтрофилами разрушение тканей чаще всего является спасительным процессом, и хозяин полагается на повреждение тканей как на один из основных источников информации, запускающей воспаление и иммунитет [21,22].

Нейтрофилы вносят важный вклад в рекрутирование, активацию и программирование дендритных клеток и макрофагов. В свою очередь, адаптивная иммунная система контролирует скорость производства нейтрофилов в костном мозге.

Нейтрофилы играют важную роль в заживлении ран, включая стерилизацию микроорганизмов, генерацию сигналов, которые замедляют скорость накопления большего количества нейтрофилов, и инициирование программы, основанной на макрофагах, которая переключает состояние поврежденного эпителия с провоспалительного и нерепликативного на противовоспалительное и репликативное.

Большое количество протеолитических ферментов различных типов, которые играют одну из ведущих ролей в процессе резорбции некротической ткани, вовремя оказываются в очаге воспаления благодаря нейтрофильным гранулоцитам[22,23].

### **1.7.2 Характеристика и функции моноцитов**

Моноциты и макрофаги - это мононуклеарные фагоциты, играющие важнейшую роль в гомеостазе тканей и иммунитете. Моноциты образуются из миелоидных клеток-предшественников в первичных лимфоидных органах, включая костный мозг и печень плода, в процессе эмбрионального и взрослого кроветворения. Через кровоток моноциты попадают в периферические ткани, где мигрируют и, в зависимости от местных факторов роста, цитокинов и микробных молекул, дифференцируются в макрофаги или миелоидные дендритные клетки (ДК). Моноциты также привлекаются к местам инфекции и обеспечивают антимикробную активность против вирусов, бактерий, грибов и простейших. В качестве первой линии защиты и моноциты, и макрофаги могут фагоцитировать

патогены и инородные частицы, выделять цитокины и генерировать активные формы кислорода (АФК) в "респираторной вспышке". Моноциты и макрофаги также участвуют в патогенезе воспалительных и дегенеративных заболеваний, например, атеросклероза, воспаления жировой ткани и инсулинорезистентности. Окислительный стресс в месте воспаления способствует дисфункции эндотелия и повреждению тканей, что приводит к миграции лейкоцитов через эндотелиальный барьер. Поскольку полиморфноядерные нейтрофилы и макрофаги являются основными производителями АФК в воспалительной ткани как после острой, так и хронической инфекции или повреждения ткани, разумно предположить, что их количество жестко регулируется. Как это происходит, в значительной степени неизвестно [23,24,25].



## **2 Объекты и методы исследования**

### **2.1 Объекты исследования**

Настоящее исследование было выполнено на базе НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН и гастроэнтерологического отделения ЧУЗ Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск. Всего было обследовано 60 больных описторхозом и 30 практически здоровых пациента в возрасте от 24 до 60 лет. Для диагностики описторхоза использовались эпидемиологические, паразитологические, иммунологические и клинико-инструментальные методы.

Объектами исследования служили моноциты и нейтрофильные гранулоциты крови, выделенные у 60 больных описторхозом, группу контроля составили практически здоровые люди с нормальными показателями клинического и биохимического анализов крови.

### **2.2 Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической крови**

Выделение общей фракции моноцитов и нейтрофилов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода нейтрофилов и моноцитов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность клеток соответствовала 98-100%. В дальнейшем 1 млн. выделенных клеток использовали для определения хемилюминесцентной активности.

Порядок выполнения работы:

1. Данная методика предполагает использование фиколл-верографин  $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$  и  $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ . Первым шагом является создание двойного градиента фиколл-верорографина.
2. Далее производится наслоение гепаринизированной крови на двойной градиент фиколл-верорографина, центрифугируют 45 мин при 1500 об.

Результатом центрифугирования являются кольца мононуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее), осадком является культура эритроцитов. Полученные кольца мононуклеарных клеток и нейтрофилов отбирают в чистые центрифужные пробирки.

3. Добавляют физиологический раствор превосходящим объемом и центрифугируют 5 мин при 1500 об. Все клетки оседают на дно, смыв супернатанта.
4. Добавляют 1 мл. раствора Хэнкса в кювету с нейтрофилами. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов.
5. Добавляют 3 мл среды RPMI в кювету с мононуклеарными клетками. Далее данную смесь переносят на пластиковую чашку Петри и инкубируют 1 час при 37 °С.
6. После инкубирования мононуклеарных клеток, среда RPMI заменяется на раствор Версена и инкубируется 20 мин при 4°С.
7. Раствор Версена с моноцитами переливают в пробирку и добавляют 9 мл. физиологического раствора. Центрифугируют 5 мин при 1500 об.
8. После центрифугирования моноциты оседают на дно пробирки, сливают супернатант. Добавляют 1 мл раствора Хэнкса. Клетки готовы к исследованию в течении 2 часов.

### **2.3 Методы исследования**

Хемилюминесценция-простой и надежный метод оценки фагоцитарной функции. Бактерицидные свойства фагоцитов зависят от продуцирования мощных окислителей при дыхательном взрыве. Эти активные кислородные радикалы вступают в реакцию с биологическими субстратами, образуя возбужденные соединения, которые затем расслабляются до своего основного состояния при испускании фотонов. Это выделение энергии происходит в форме света, который может быть усилен хемилюминесцентными зондами и измерен

люминометром. Активация клеток достигается с помощью различных агентов, стимулирующих дыхательный взрыв.

При изучении интенсивности выработки активных форм кислорода (АФК) в культуре моноцитов и нейтрофильных гранулоцитах крови использовался метод хемилюминесцентного анализа. В том числе хемилюминесцентный анализ применялся в ответ на внешний стимул (зимозан). Выявлялась активность люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Исследования первичных АФК (супероксидный анион) проводились с помощью активатора люцигенина, а исследования вторичных АФК ( $H_2O_2$ ,  $OH$ ,  $HOCl$ ) основывались на люминоле. При помощи спонтанной хемилюминесцентной реакции изучали базовый уровень функциональной активности моноцитов. Резервные возможности клеток выявляли при стимуляции зимозаном.

Для оценки хемилюминесцентной активности применялся 36-канальный хемилюминесцентный анализатор CL3606 (Россия), в течение 90 минут. Характеристику состояния респираторного взрыва осуществляют по следующим показателям, регистрируемым отдельно для спонтанной и индуцированной хемилюминесценции: время выхода на максимум, максимум интенсивности хемилюминесценции, площадь под кривой хемилюминесценции и индекс активации. Время выхода на максимум характеризует длительность развития максимальной активности синтеза АФК от момента антигенной или регуляторной индукции респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Максимум интенсивности хемилюминесценции определяет максимальную активность синтеза АФК клеткой. Площадь под кривой хемилюминесценции, интегрально характеризует весь комплекс АФК, вырабатываемых фагоцитами за исследуемый период. Максимум интенсивности и площадь под кривой также зависят от функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Индекс активации вычисляется через отношение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции к площади под кривой спонтанной

хемилюминесценции и характеризует наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва.

Из показателей перекисного окисления липидов было исследовано содержание малонового диальдегида(МДА). Для изучения антиоксидантной системы будет определяться активность супероксиддисмутазы(СОД) и каталазы(САТ).

Для определения показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в рамках иммуноферментного анализа, мы обратились к наборам ИФА, специфичным к определенному ферменту. Наборы предназначены для количественного измерения активности в сыворотке, плазме, гемолизате, тканевых гомогенатах и т. д. Измерения проводятся в видимом световом диапазоне. Значение концентрации исследуемого образца получили методом колориметрии. Согласно калибровочному графику, находят значение концентрации, соответствующее уровню измеренной плотности окраски раствора.

#### **2.4 Статистические методы исследования**

Результаты исследований оценивались согласно общепринятым методам статистического анализа. Статистическая обработка проводилась на персональном компьютере при помощи пакета прикладных программ Statistica (версия 7.0) и SPSS (v.12.0). Для количественных показателей описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (C25 и C75). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Со страницы 20 по 26 изъято в связи с авторскими правами.













### **3 Выводы**

1. В результате исследования люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови, отражающей общий пул свободных радикалов клеток, было выявлено снижение их функциональной активности у больных описторхозом относительно здоровых лиц.
2. В результате исследования люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови, отражающей активность супероксидного анион радикала клеток, было выявлено снижение всех параметров ( $S_{max}$ ,  $I_{max}$ ,  $T_{max}$ ) у больных описторхозом относительно здоровых лиц.
3. Исследование антиоксидантной системы показало повышение активности фермента Каталазы (CAT) у больных описторхозом относительно контроля.

#### 4 Список литературы

1. Разумов И.А., Львова М.Н., Пономарева Е.П. и др. Антигенные свойства рекомбинантного аналога белка легумина трематоды *Opisthorchis felinus*, вызывающей описторхоз у человека // Бюллетень сибирской медицины. 2012. Т. 11. № 6.
2. Jongsursuntigul P., Imsomboon T. Epidemiology of opisthorchiasis and national control program in Thailand // Southeast Asia J. Trop. Med. Public Health. – 1998. Vol. 29, №3
3. Doanh P.N., Nawa Y. Clonorchis sinensis and Opisthorchis spp. in Vietnam: current status and prospects // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. - 2016. - vol. 110.
4. Sripa B., Kaewkes S., Intapan P.M. et al. Food-borne trematodiasis in Southeast Asia epidemiology, pathology, clinical manifestation and control // Advances in Parasitology. 2010. - vol. 72. - P. 305–350.
5. Кузнецова В.Г., Краснова Е.И., Патурина Н.Г. Описторхоз в клинической практике врача-инфекциониста // Лечащий врач. 2013. № 6.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. - 1998. - №7. - С. 43-51.
7. Kaneto H. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis / Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T. //Mediators of Inflammation in Obesity and Its Co-Morbidities. – 2010. – vol. 2010.
8. Unuofin J.O. Antioxidant Effects and Mechanisms of Medicinal Plants and Their Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: An Updated Review / Lebelo S.L. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – vol. 2020.
9. G. E. Forcados, D. B. James, A. B. Sallau, A. Muhammad, and P. Mabeta, “Oxidative stress and carcinogenesis: potential of phytochemicals in breast cancer therapy,” Nutrition and Cancer, vol. 69, no. 3, pp. 365–374, 2017.
10. E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci //Oxidative Stress and Antioxidant Defense. – 2012. - P. 9-19.

11. Marnett L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde // *Mutation Research* — Elsevier, 1999. — vol. 424, № 1 - 2. — P. 83—95.
12. Schröder K. NADPH oxidases: Current aspects and tools. // *Redox Biology*. - 2020. - vol. 34.
13. Ruan L. Characterization of a novel extracellular Cu-Zn superoxide dismutase from *Rimicaris exoculata* living around deep-sea hydrothermal vent / Lin W., Shi H., Wang C., Chen D., Zou C., Ren J., Li X.// *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – vol. 163. – P. 2346-2356.
14. Y. Wang, Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi// *J. Cell Biol.* – 2017. - vol.207. P. 1915-1928.
15. Galasso M. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer / Gambino S., Romanelli M.G., Donadelli M., Scupoli M.T // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – vol. 172. – P. 264-272.
16. Vigneshkumar B. Catalase activity and innate immune response of *Caenorhabditis elegans* against the heavy metal toxin lead / Pandian S.K., K. Balamurugan K.// *Environ. Toxicol.* – 2013. – vol. 28.
17. Kirkman H.N. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries/ G.F. Gaetani // *Trends Biochem. Sci.* – 2007. – vol. 32.
18. J.C.Hodgson J.C. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and the effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocytes in vitro /Watkins C.A., Bayne C.W. // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2006. – vol. 112. P. 12-23.
19. Thomas D.C. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. // *Immunology Letters*. – 2017. – vol. 192. – P. 88-96.
20. Ginhoux F. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis / Jung S. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. vol. 14. P. 392-404.

21. Strecker J.-K. Neutrophil granulocytes in cerebral ischemia – Evolution from killers to key players / Schmidt A., Schäbitz W-R., Minnerup J. // *Neurochemistry International*. – 2017. – vol. 107. – P. 117-126.
22. Berte N. Impaired DNA repair in mouse monocytes compared to macrophages and precursors/Eich M.,Heylmann D.,Koks C., W.Van Gool S., Kaina B.// *DNA Repair*. – 2021. – vol.98.
23. Krenkel O., Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, vol. 17, no. 5, pp. 306–321.
24. Shi C. Monocyte recruitment during infection and inflammation / Pamer E.G. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. vol. 11. P. 762-774.
25. Lauvau G. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites / Loke P., Hohl T.M. // *Semin. Immunol.* – 2015. vol. 27. P 397-409.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ  
КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
В.А. Кратасюк Кратасюк В.А.  
подпись      инициалы, фамилия  
« 28 » июня 20 21 г.

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02. Физика

Активность свободных радикалов кислорода у больных описторхозом

Руководитель

О.А. Коленчукова  
подпись, дата      должность, ученая степень      инициалы, фамилия

Выпускник

Д.Е. Чуяшенко  
подпись, дата      инициалы, фамилия

Красноярск 2021