

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.К. Шишацкая

подпись

« 23 » июня 20 17 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состояние метаболизма и интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов
при остром панкреатите

Руководитель



Профессор, д.м.н.

Савченко А.А.

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

ББ13-01Б

041313237

28.06.17


Иванюшина Е.А.

номер группы

номер зачетной книжки

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск

2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
1.Обзор литературы	4
1.1 Панкреатит	4
1.1.1 Причины развития панкреатита	4
1.1.2 Показатели активности нейтрофилов у больных панкреатитом	7
1.2 Роль нейтрофилов в иммунной системе человека	8
1.3 Гемостаз, показатели гемостаза	12
1.3.1 Гемостаз сосудисто-тромбоцитарный.....	12
1.3.2 Гемостаз коагуляционный.....	14
1.3.3 Показатели гемостаза	15
1.4 Хемилюминесценция (как метод).....	24
1.4.1 Люминол-зависимая хемилюминесценция	26
1.4.2 Люцигенин-зависимая ХЛ как метод количественного определения супероксидных радикалов.....	26
2 Объект и методы исследования	31
2.1 Объект исследования	31
2.2 Методика оценки фагоцитоза	32
2.3 Определение хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови	32
3 Результаты и обсуждение.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

За последние 30 лет отмечена общемировая тенденция к увеличению заболеваемости острым панкреатитом более чем в два раза. Заболеваемость острым панкреатитом и его основные причины (злоупотребление алкоголем, желчнокаменная болезнь, метаболические расстройства, лекарственные средства) в разных странах различны. Так, в США острый панкреатит чаще обусловлен злоупотреблением алкоголем, чем желчнокаменной болезнью, а в Великобритании – наоборот [4]. По статистике заболеваемость острым панкреатитом в России составляет 36-40 случаев на 100.000 населения. В 15-25% случаев острый панкреатит носит тяжелый деструктивный характер и сопровождается различными осложнениями, которые являются основной причиной летального исхода. Летальность при панкреонекрозе остается крайне высокой и по данным различных авторов составляет от 15 до 90%. При несложных подсчетах получается, что в год в стране заболевает острым панкреатитом от 52.200 до 58.000 человек. Основным патологическим процессом при остром панкреатите является воспаление различной тяжести [22]. Нейтрофилы первые мигрируют в очаг воспаления [7], где осуществляют свою главную функцию, формирование первой линии защиты:

- опознают и фагоцитируют бактерии, образуя фагосомы;
- специфические гранулы затем сливаются с фагосомами, обеспечивая переваривание их содержимого;
- азурофильные гранулы также сливаются с фагосомами, выделяя в них свои гидролитические ферменты, переваривая микроорганизмы и часто убивая саму клетку [6].

Согласно ферментативной теории развития острого панкреатита некротические процессы, эндотоксикоз, полиорганную недостаточность связывают с резкой нефизиологической активацией пищеварительных ферментов в поджелудочной железе с последующим поражением ее тканей этими ферментами и их поступлением в кровоток [43,46]. Системное

повреждение сосудистого эндотелия при ОДП ведет к активации свертывающей системы, что, в свою очередь, требует запуска механизмов распознавания поврежденных клеток и удаления активированных факторов свертывания из кровотока, в которых ключевую роль играют клетки врожденного иммунитета. Нарушения в системе гемостаза и иммунной системе, находясь в прямой зависимости от глубины патоморфологических изменений в поджелудочной железе, взаимно отягощают друг друга и являются пример срыва межсистемной регуляции [44,45]. Однако особенности функционирования нейтрофильных гранулоцитов, как основных клеток врожденного иммунитета, при ОДП до сих пор не изучены.

В связи с этим, целью исследования явилось изучение взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных ОДП.

Цель работы: изучить взаимосвязи между показателями функционально-метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных острым деструктивным панкреатитом (ОДП).

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Определить метаболическую и функциональную активность нейтрофилов крови в норме и при остром панкреатите;
2. Проанализировать различия показателей гемостаза групп здоровых и больных ОДП;
3. Установить взаимосвязь функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и показатели гемостаза у больных ОДП.

1. Обзор литературы

1.1 Панкреатит

Панкреатит (греч. pancreatos, поджелудочная железа) - заболевание поджелудочной железы с острым или хроническим течением, в основе которого - активация протеолитических ферментов не в просвете кишечника, а непосредственно в поджелудочной железе. Выделяют две основные формы острого панкреатита, между которыми имеется ряд промежуточных вариантов, - отечный панкреатит, характеризующийся легким течением и самопроизвольным разрешением, и панкреонекроз, при котором тяжесть состояния соответствует степени некроза поджелудочной железы.

1.1.1 Причины развития панкреатита

В 95-98% случаев причинами острого деструктивного панкреатита являются употребление алкоголя и заболевания желчного пузыря (прежде всего, желчнокаменная болезнь).

Существуют и другие факторы риска, которые могут спровоцировать воспаление поджелудочной железы:

- Операции (на органах брюшной полости и на других органах)
- Эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография, особенно с холангиоманометрией
- Травмы (особенно тупая травма живота)
- Метаболические нарушения
- Наследственный панкреатит
- Инфекции
- Лекарственные средства
- Нарушения кровоснабжения поджелудочной железы
- Пенетрирующая язва желудка или двенадцатиперстной кишки
- Обтурация фатеровой ампулы
- Раздвоенная поджелудочная железа [3].

При этом примерно у 30% больных не удается установить причину острого панкреатита.

У здорового человека в поджелудочной железе вырабатываются неактивные предшественники ферментов — их в активную форму переход происходит непосредственно в 12-перстной кишке, куда они поступают по протоку поджелудочной железы и общему желчному протоку.

При повышении давления в протоке поджелудочной железы, под влиянием различных факторов, нарушается отток ее секрета, и происходит преждевременная активация ферментов. В следствие этого ферменты начинают переваривать саму поджелудочную железу, что приводит к острому воспалению. КТ позволяет оценить тяжесть поражения поджелудочной железы.

	Балл
Воспаление	
А. Нормальная поджелудочная железа	0
Б. Только увеличение поджелудочной железы	1
В. Воспаление в пределах поджелудочной железы и окружающей жировой клетчатки	2
Г. Один очаг скопления жидкости	3
Д. Два и более очага скопления жидкости	4
Некроз	
А. Отсутствие некроза	0
Б. Некроз одной трети поджелудочной железы	2
В. Некроз половины поджелудочной железы	4
Г. Некроз более половины поджелудочной железы	6

Таблица 1. Оценка тяжести острого панкреатита по данным КТ.

Компьютерная томография позволяет выявить некроз поджелудочной железы и определить его границы. Выяснено, что если тяжесть панкреатита по критериям КТ соответствует 1-2 баллам, то вероятность затяжного течения панкреатита или серьезных осложнений практически нулевая, 3-6 баллам - низкая. При оценке в 7-10 баллов вероятность осложнений и летального исхода составляет соответственно 92 и 17% [12]. Так при остром деструктивном панкреатите (ОДП), который характеризуется локальным воспалением ткани поджелудочной железы, в любом периоде течения ОДП может возникнуть синдром системной воспалительной реакции (ССВР) [18]. Известно, что цитокины первоначально регулируют развитие местных защитных реакций путем формирования типичной воспалительной реакции с ее классическими местными проявлениями и реализующей механизмы естественной противомикробной устойчивости. Показано, что общим звеном в патогенезе

острого панкреатита является нарушение баланса системы провоспалительных цитокинов и противовоспалительных медиаторов. Общим проявлением является повышение интерлейкинов 1 β , 2, 6, 4, 8, и ФНО- α [19]. Баланс между двумя этими группами во многом определяет характер течения и исход заболевания. При первичном определении обнаружено достоверное по отношению к аналогичным показателям здоровых доноров увеличение концентрации провоспалительных цитокинов: TNF- α в 8-11 раз, IL-8 в 10-14 раз и IFN- γ в 1,5-2 раза. При этом клиническая симптоматика ферментативной интоксикации включала признаки ССВР. При этом замечено достоверное нарастание концентрации в сыворотке крови пациентов противовоспалительного IL-4 (в среднем, в 5-9 раз), что говорит о раннем запуске стадии компенсаторного противовоспалительного ответа (CARS). Отмечалось уменьшение концентрации IL-2 в системном кровотоке (в среднем в 2,5 раза), что приводит к нарушению цитокиновой регуляции, блокаде структур антигенного распознавания, что в условиях избытка антигенов и предопределяет ранние проявления иммунодефицита (ИД). Отмечалась устойчивая обратная связь (коэффициент корреляции 0,87-1,0) между падением содержания IL-2 и повышением концентрации остальных исследуемых цитокинов в сыворотке крови.

Таким образом, с первых суток развития ОДП наблюдается несколько параллельно протекающих и взаимозависимых процессов: формирование панкреонекроза с развитием блокады полноценного иммунного ответа на фоне гиперпродукции цитокинов, (особенно IL-8 и TNF- α) вызывающих ряд симптомов эндотоксикоза, а также принимающего участие в генезе ПОН и ранних летальных исходов. Оценка соотношения цитокинов в этот период выявляет дефицит IL-2 и относительную недостаточность IFN- γ , что предопределяет нарушения клеточно-опосредованной системы иммунной защиты. В результате дисбаланса цитокиновой регуляции иммунного ответа является развитие «иммунного паралича» за счет несостоятельности клеточного, гуморального и неспецифического звеньев иммунитета с

нарушением противоинфекционной защиты, и, возможно, с массивной аутоагрессией иммунной системы против собственных антигенов (поврежденных тканей и клеток-иммуноцитов). Эти иммунопатологические нарушения усугубляются цитокин-опосредованным повреждением систем жизнеобеспечения организма [20]. На фоне иммунопаралича наблюдается статистически значимое уменьшение доли нейтрофилов их активация [21].

1.1.2 Показатели активности нейтрофилов у больных панкреатитом

Так как нейтрофилы первыми идут в очаг воспаления изучение состояния их показателей у больных панкреатитом является важной частью диагностики [8]. По их количеству и состоянию их функций можно составить картину течения болезни. Во время обзора литературы выявила, что иммунологические показатели больных различными формами панкреатита отличаются от контрольных. Так в своей работе Ершов А.В. и др. представили иммунологические показатели (в том числе фагоцитарную активность) больных острым деструктивным панкреатитом, где отчетливо выявлено однонаправленное изменение показателей, свидетельствующих о равнозначном напряжении всех звеньев иммунитета, задействованных в нейтрализации чужеродных антигенов [13]. В ряде работ отмечена недостаточность метаболической активности нейтрофилов [15, 16]. В работе Винник и др. были представлены показатели анализа крови. У больных различными формами панкреатита количество сегментоядерных нейтрофилов в крови были в норме, но количество палочкоядерных нейтрофилов превышало норму минимум в 4-5 раз [14].

1.2 Роль нейтрофилов в иммунной системе человека

Нейтрофилы — основная часть циркулирующих, фагоцитирующих полиморфонуклеарных гранулоцитов, характеризующихся тем, что они одни из первых попадают в ткани при развитии воспалительного ответа, где осуществляют антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность [8]. Развитие нейтрофилов контролируется цитокинами, из которых ведущую роль играет G-CSF, а вспомогательную—GM-CSF, IL-3 и IL-6. Повышение содержания нейтрофилов в условиях воспаления регулируется цитокинами IL-17 и IL-23. IL-23 вызывают образование IL-17, а он стимулирует выработку G-CSF. В крови человека содержится $2,0—7,5 \times 10^9$ /л нейтрофилов, что составляет 50—70% от общего числа лейкоцитов крови; также в крови присутствует некоторое количество ($0,04—0,3 \times 10^9$ /л, т.е. 1—6%) палочкоядерных форм нейтрофилов, не завершивших созревание. Ядро таких клеток не сегментировано, хотя и имеет уплотненную структуру хроматина. В кровотоке присутствует только 1—2% общего числа зрелых нейтрофилов в организме (остальные представлены в тканях, преимущественно в костном мозгу). Срок их пребывания в циркуляции составляет 7—10 ч. После кратковременной циркуляции нейтрофилы покидают кровоток и мигрируют в ткани. Примерно 30% нейтрофилов, выходящих из кровотока, мигрируют в печень и костный мозг; около 20%— в легкие (точнее в их микроциркуляторное русло); около 15%— в селезенку. Основными хемотаксическими факторами и через 3—5 сут пребывания в тканях нейтрофилы подвергаются спонтанному апоптозу, и их фагоцитируют резидентные макрофаги, что останавливает нанесение ущерба окружающим клеткам. В настоящее время допускается возможность превращения небольшой фракции тканевых нейтрофилов в долгоживущую форму и даже их дифференцировки в макрофаги. В целом функция тканевых нейтрофилов остается невыясненной. Диаметр нейтрофилов составляет 9—12 мкм. Им свойственна уникальная морфология: сегментированное ядро (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно упакованным хроматином (гетерохроматином); цитоплазма содержит нейтральные (по данным

окрашивания) гранулы, что и определяет название этих клеток. Особенности хроматиновой структуры ядра (недоступность промоторных участков для дифференцировочных факторов) значительно сдерживают экспрессию генов и синтез макромолекул нейтрофилами *de novo*. Тем не менее, вопреки ранее существовавшим представлениям, нейтрофилы сохраняют способность к биосинтезу, хотя и в ограниченном масштабе. Поскольку нейтрофилы обладают характерной морфологией, необходимость в определении их мембранного фенотипа возникает только при специальном цитометрическом анализе. Для нейтрофилов характерна 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), α 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 действием ряда цитокинов (прежде всего GM-CSF) нейтрофилы вырабатывают молекулы MHC класса II (MHC-II); молекулы MHC-I экспрессируются на них конститутивно. Наиболее важные молекулы, определяющие развитие, миграцию и активацию нейтрофилов,—рецепторы для G-CSF (основного фактора, регулирующего их развитие), а также для IL-17 и IL-23, основного хемотаксического фактора —IL- 8 (CXCR1, CXCR2) и хемокина, определяющего связь нейтрофилов с тканями —SDF-1 (CXCR4)[7]. Гранулы нейтрофилов традиционно делят на первичные, вторичные, третичные и секреторные пузырьки. Различия между классами гранул могут быть определены после анализа белков-маркеров. В гранулах нейтрофилов находятся около 300 различных белков, которые могут быть освобождены в окружение клетки или оставаться присоединенными к мембране нейтрофилов. Секреторные пузырьки формируются только в зрелых сегментоядерных нейтрофилах при поступлении их в кровотоки. Секреторные пузырьки по происхождению эндосомы, и являют собой пул рецепторов, включаемых в плазматическую мембрану после слияния мембраны

секреторных пузырьков с мембраной нейтрофила. В мембране секреторных пузырьков множество рецепторов - β 2-интегрины, Cr1, рецепторы формил-пептида (fpr), CD14, CD16, а также ферменты металлопротеиназы и щелочная фосфатаза. В полости секреторных пузырьков содержится альбумин и белок, связывающий гепарин (НВР). Маркерный фермент пузырьков - щелочная фосфатаза. Пероксидазонегативные гранулы нейтрофилов могут быть разделены на вторичные и третичные, которые отличаются содержанием белков и секреторными свойствами. Во вторичных гранулах содержатся больше антибактериальных соединений, чем в третичных. При этом третичные гранулы легче, чем вторичные подвергаются экзоцитозу. Третичные гранулы – резерв матрикс-деградирующих ферментов и мембранных рецепторов, необходимых для экстравазации и диапедеза нейтрофила. Вторичные же гранулы участвуют главным образом, в антибактериальных действиях нейтрофилов путем мобилизации в фагосомы или секрецию во внешнюю среду. В арсенале их антибактериальных пептидов - лактоферрин, NGAL, лизоцим и hCAP18, LL-37. Маркерный белок третичных гранул - фермент желатиназа, вторичных – лактоферрин. В первичных гранулах содержатся кислые гидролазы, в том числе кислая фосфатаза и антибактериальные белки; их мембрана лишена рецепторов. У человека нейтрофильные пептиды выступают в роли антибактериальных белков– α -дефензинами и сериновыми протеазами с антибактериальной активностью. При созревании нейтрофилов в костном мозге первыми еще на стадии миелобластов формируются азурофильные гранулы; дефензины (катионные белки) в азурофильных гранулах образуются на второй стадии дифференцировки нейтрофилов - стадии образования промиелоцитов. Во время фагоцитоза, фагоцитирующие клетки увеличивают потребление глюкозы и кислорода, этот процесс называют респираторный взрыв[1]. Развитие кислородного взрыва осуществляется в течение нескольких секунд, что и определило название этих процессов как «взрыв». Кислородный взрыв происходит под влиянием многих активирующих агентов, некоторых хемоаттрактантов, цитокинов, ряда лекарственных препаратов.

Кислородзависимые факторы, вырабатываемые при участии миелопероксидазы, обладают токсичностью в отношении не только бактерий, но и грибов, микоплазм. При продукции токсичных метаболитов кислорода вне клетки происходит повреждение тканей[2]. Образование активных форм кислорода является следствием респираторного взрыва. АФК способны убить бактерии в составе фаголизосомы. Этот процесс называют кислород-зависимый внутриклеточный киллинг.

В процессе фагоцитоза включается механизм прямого окисления глюкозо-6 -фосфата в пентозофосфатном пути с образованием НАДФН. Тотчас осуществляется сборка надмолекулярного комплекса активной молекулы НАДФН. Активированная НАДФН-оксидаза использует кислород для окисления НАДФН. В результате реакции образуется супероксид-анион. Под действием супероксиддисмутазы часть супероксид-анион превращается в синглетный кислород и H_2O_2 . Другая часть супероксид-анион взаимодействует с H_2O_2 с образованием гидроксильных радикалов и синглетного кислорода. В результате всех этих реакций образуются токсичные кислорода соединений супероксид-анион перекись водорода, синглетный кислород и гидроксильные радикалы ($OH \bullet$)[1].

1.3 Гемостаз, показатели гемостаза

Системой гемостаза называют совокупность компонентов кровеносных сосудов, крови и их взаимодействий, которая обеспечивает поддержание целостности кровеносных сосудов, жидкое состояние крови внутри сосудов и остановку кровотечения при повреждении сосуда. Механизмы гемостаза запускаются при повреждении эндотелия, при контакте крови с соединительной тканью субэндотелиального слоя.

Сосудисто-тромбоцитарный (он же первичный) гемостаз состоит в образовании в месте повреждения тромбоцитарного тромба. Процесс начинается в первые секунды после повреждения и играет главную роль в остановке кровотечения из капилляров, мелких артериол и венул.

Коагуляционный (вторичный) гемостаз, или свертывание крови, протекает в течение нескольких минут и представляет собой каскад реакций между плазменными белками, приводящим к образованию нитей фибрина. При помощи этого каскада останавливается кровотечение из крупных сосудов и предотвращается их возобновление через несколько часов или суток.

Сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз непрерывно связаны друг с другом. Так, активированные тромбоциты помогают процессу свертывания, а продукты свертывания (например, тромбин) активируют тромбоциты [25].

1.3.1 Гемостаз сосудисто-тромбоцитарный

Под сосудисто-тромбоцитарным (первичным) гемостазом понимают прекращение или уменьшение кровопотери за счет сокращения (спазма) травмированного сосуда и образования тромбоцитарного агрегата ("тромбоцитарной пробки", "первичной гемостатической пробки") в зоне повреждения сосуда. Данные реакции в совокупности обеспечивают полную остановку кровотечения из капилляров и венул, но кровопотеря из вен, артериол и артерий прекращается лишь частично. Это обусловлено тем, что

кровь в них движется под относительно высоким давлением, и поэтому рыхлая структура тромбоцитного агрегата не образует непроницаемую преграду для истечения крови (она проницаема тем более, чем выше давление в сосуде). Первичный гемостаз называют иногда также временным, имея в виду, что тромбоцитный агрегат может обеспечить остановку кровотечения, но не всегда и не полностью. Кроме того, цепь гемостатических реакций не заканчивается образованием "тромбоцитной пробки". То есть, первичный гемостаз является лишь первым этапом в остановке кровотечения. Этот процесс начинается в первые секунды после повреждения и играет ведущую роль в остановке кровотечения из капилляров, мелких артериол и венул [26].

Этапы сосудисто-тромбоцитарного гемостаза

I. Адгезия тромбоцитов (Platelet adhesion) - это прилипание тромбоцитов к компонентам субэндотелия (в частности, к коллагену).

Адгезия тромбоцитов осуществляется путем связывания гликопротеинов Ib мембран тромбоцитов с коллагеном при посредстве комплекса фактора свертывания VIII.

Адгезия к волокнам коллагена происходит в первые секунды после повреждения благодаря наличию на тромбоцитах рецепторов к коллагену - гликопротеида Ia/IIa, относящегося к семейству интегринов. Стабилизация образовавшегося соединения фактором фон Виллебранда не дает току крови смывать тромбоциты. Фактор фон Виллебранда образует связь между субэндотелиальными волокнами коллагена и другим рецептором тромбоцитов - гликопротеидом Ib/IX. В следствие адгезии тромбоциты активируются и выбрасывают ряд активных веществ - как заранее запасенных в их гранулах (дегрануляция), так и образующихся при активации [27].

II. Активация и дегрануляция тромбоцитов. При повреждении сосуда становится возможным контакт тромбоцитов с субэндотелиальными структурами стенки сосуда (коллаген, микрофибриллы), способными

активировать. Активация тромбоцитов приводит к изменению дисковидной формы тромбоцитов на сферическую, образованию у них псевдоподий и прикреплению тромбоцитов к субэндотелиальным структурам, в частности к коллагену.

Вследствие активации начинается также начальная агрегация тромбоцитов и высвобождение из сильных стимуляторов тромбоцитов (АДФ, серотонин, адреналин, нестабильные простагландины, тромбоксан А₂, тромбоцитоактивирующий фактор) [28].

III. Агрегация тромбоцитов.

Нарушения на любом из этих этапов могут привести к кровоточивости.

1.3.2 Гемостаз коагуляционный

Коагуляционный гемостаз, или свертывание крови, протекает в течение нескольких минут и представляет собой каскад реакций между плазменными белками, заканчивающийся образованием нитей фибрина. Именно благодаря этому останавливается кровотечение из крупных сосудов и предотвращается их возобновление через несколько часов или суток. Одновременно с образованием тромбоцитарного тромба активируются факторы свертывания и запускается коагуляционный гемостаз. В процессе коагуляционного гемостаза на основе тромбоцитного агрегата образуется сгусток крови, который на завершающей стадии подвергается самопроизвольному сжатию (ретракция сгустка крови), приводящая к превращению во вторичную или окончательную гемостатическую пробку, в которой тромбоцитный агрегат консолидируется фибрином и подвергается дополнительному уплотнению в процессе спонтанного сокращения сгустка крови. Вторичный гемостаз обеспечивает полную остановку кровотечения из вен, артериол и артерий [42].

1.3.3 Показатели гемостаза

ПТИ (протромбиновый индекс). Протромбиновый индекс рассчитывается как соотношение времени свёртывания плазмы пациента к времени свёртывания контрольной плазмы, выраженное в процентах. Норма составляет 95-105%.

Протромбиновый индекс ниже нормы свидетельствует о гипокоагуляции (наличие склонности к кровотечениям) и может быть обусловлено:

- Недостатком витамина К, который необходим для синтеза факторов свертывания крови (дефицит витамина К наблюдается при дисбактериозе и заболеваниях кишечника);
- приемом кровесвёртывающих препаратов;
- заболеваниями печени с нарушением синтеза факторов свертывания крови;
- врожденным дефицитом определенных факторов свертывания крови;
- выраженным наследственным или приобретенным дефицитом фибриногена в крови.

Протромбиновый индекс выше нормы свидетельствует о гиперкоагуляции и может быть обусловлен:

- врожденным недостатком II, V, VII, X факторов свёртывания крови.
- приобретенным недостатком факторов свёртывания крови вследствие нефротического синдрома, амилоидоза, нарушениях функции печени при хронических заболеваниях.
- дефицитом витамина К.
- использованием в лечении антикоагулянтов непрямого действия.
- присутствием ингибиторов свёртывания крови (гепарина).
- ДВС-синдром при онкологических заболеваниях - острых и хронических лейкозах.
- применением некоторых лекарственных препаратов: антибиотиков, анаболических стероидов, слабительных средств, ацетилсалициловой кислоты (в больших дозах), никотиновой кислоты, хинидина, тиазидных диуретиков, хинина.

Кроме того, протромбиновый индекс выше нормы может наблюдаться при длительном приеме контрацептивов гормонального генеза [29].

Фибриноген - белок, синтезируется в печени и участвует в образовании тромба. Фибриноген - один из факторов свертывающей системы крови (первый фактор свертывания - Фактор I), из которого на последних этапах тромбообразования образуется фибрин - белок, составляющий основу кровяного сгустка [30]. Норма – 2,00-4,00 г/л.

Содержание увеличивается

- Различные воспалительные процессы при заболевании почек (гломерулонефрит, острый и хронический пиелонефрит), перитонит, пневмонии.
- Инфаркт миокарда.
- Коллагенозы.
- Реакция острой фазы при инфекционных заболеваниях, травмах, ожогах, хирургических вмешательствах.
- Амилоидоз.
- Беременность, менструация.
- Злокачественные опухоли (особенно рак легкого).

Содержание уменьшается

- Наследственный дефицит.
- ДВС-синдром (внутрисосудистое диссеминированное свертывание).
- Употребление ряда лекарственных препаратов (фенобарбитал).
- Состояние после кровотечения.
- Тромболитическая терапия.
- Лейкозы.
- Заболевания печени (цирроз, отравление гепатотропными ядами).
- Рак простаты с метастазами.
- Поражение костного мозга (метастазы в костный мозг) [31].

РФМК (растворимые фибрин-мономерные комплексы) - представляют собой высокомолекулярные комплексы фибрина с фибриногеном, а также продуктами его распада, возникновение которых характерно для активации системы свертываемости крови в ответ на нарушение целостности кровеносных сосудов. В норме количество фибрин-мономерных комплексов составляет 3,36-4,0 мг на 100 мл плазмы крови человека, и довольно часто они представляют собой переходные формы между фибрином и фибриногенами. Нарушение количества РФМК говорит о патологии системы гемостаза и является маркером тромбинемии при внутрисосудистом свертывании крови [32].

Отклонение от нормы в сторону повышения свидетельствуют о наличии:

- тромбофилии;
- геморрагического васкулита;
- ДВС-синдрома (диссеминированного внутрисосудистого свертывания);
- тяжелых травм, ожогов;
- заболеваний печени.
- период вынашивания ребенка;
- чрезмерные физические нагрузки;
- сильные эмоциональные перегрузки) [33].

РФМК может быть ниже нормы во время приема антикоагулянтов, как правило, при нарушении рекомендованных доз [34].

Антитромбин III - Антитромбин III связывает все активированные факторы свертывания, относящиеся к сериновым протеазам, за исключением фактора VII. Его активность резко увеличивается гепарином и гепариноподобными молекулами на поверхности эндотелия. Это свойство гепарина лежит в основе его антикоагулянтного действия.

Антитромбин III образуя комплексы с активированными факторами, блокирует действие свертывания с ними. Эта реакция, ускоряется

гепариноподобными молекулами в сосудистой стенке и на эндотелиальных клетках.

Уровень антитромбина III в плазме в норме составляет 5-15 мг/л (50-150%)[36].

Содержание увеличивается

- Терапия антикоагулянтами.
- Острый вирусный гепатит.
- Дефицит витамина К.
- Острый панкреатит.
- Опухоли поджелудочной железы.
- Лечение анаболическими гормонами.
- Воспаление.

Содержание уменьшается

- Врожденный недостаток антитромбина III.
- Последний триместр беременности.
- Тромбозы.
- Лечение кортикостероидами.
- Острый ДВС-синдром.
- Цирроз печени, гепатиты.
- Тромбоэмболия.
- Введение больших доз гепарина.
- Продолжительный прием пероральных противозачаточных средств [38].

ТВ (тромбиновое время) - показатель системы свертывания крови (превращение фибриногена в фибрин). Основные показания к применению: общая оценка системы свертывания крови, оценка течения ДВС-синдрома - (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания). Применять анализ целесообразно совместно с АЧТВ и ПВ.

Тромбиновое время — время, в течение которого происходит превращение фибриногена в фибрин в цитратной плазме после добавления в неё кальция и тромбина. Скорость формирования сгустка фибрина чаще зависит от количества фибриногена и наличия антикоагулянтов в крови пациента.

Тромбин является протеолитическим ферментом - он катализирует превращение растворимого белка плазмы крови фибриногена в нерастворимый белок фибрин. Поэтому активность тромбина определяется количеством субстрата - фибриногена.

Эволюционно тромбин близок к сериновым протеазам поджелудочной железы. Способность расщеплять связь между остатками глицина и аргинина свидетельствует о его сходстве с трипсином. Однако тромбин расщепляет только определенные связи аргинин-глицин, тогда как трипсин гидролизует практически все пептидные связи, следующие за остатками аргинина.

Активность тромбина характеризуется количеством субстрата - фибриногена. Из чего следует, что тромбиновое время отражает дефицит факторов свертывания, и в частности фибриногена (фибриноген - фактор свертывания № 1), участвующего на последних этапах формирования тромба. Таким образом, определение ТВ является показателем функционального состояния финальной стадии общего пути каскада свертывания крови – превращения фибриногена в фибрин и показывает время превращения фибриногена в фибрин в цитратной плазме при добавлении кальция и тромбина.

Тромбиновое время удлиняется:

- Афибриногенемия.
- Крайне низкое содержание фибриногена - гипофибриногенемия (меньше 0,5 г/л).
- Острый фибринолиз.
- Повышение уровня фибриногена более чем 4 г/л.

- ДВС-синдром.
- Фибринолитическая терапия (использование урокиназы, стрептокиназы).
- Паренхиматозные гепатиты.
- Цирроз печени.
- Терапия гепарином.
- Наличие антитела к тромбину.

Тромбиновое время укорачивается (свидетельство гиперкоагуляции)

- Наличие ингибиторов фибрина (при лечении гепарином) и наличие ингибиторов полимеризации фибрина.
- Первая стадия ДВС-синдрома - выраженное повышение фибриногена в крови и дисфибриногемия [40].

АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) – обозначает время, за которое образуется фибриновый сгусток, с использованием различных реагентов, например, хлорида кальция. АЧТВ отражает эффективность внутреннего и общего каскада свертывающей системы крови, входящих в состав первой фазы свертывания. Определение частичного тромбопластинового времени является обязательным элементом контроля приема антикоагулянтных препаратов. С помощью теста можно обнаружить склонность человека к кровотечениям и активность свертывающих факторов в его организме, отражает активность внутреннего механизма свертывания и уровень высокомолекулярного кининогена и прекалликреина, а так же факторов XII, XI, IX и VIII. В норме фибриновый сгусток образуется за 21-35 секунд [35].

На удлинение АЧТВ – гипокоагуляция (свидетельство о возможном дефиците факторов внутреннего звена гемостаза), влияют:

- Гемофилия. Врожденная/приобретенная недостаточность факторов свертывания крови II, V, VIII, IX, X, XI, XII за исключением факторов VII и XIII;
- Фибринолиз;

- II и III фазы ДВС- синдрома (коагулопатия потребления и глубокая гипокоагуляции, вплоть до полного несвертывания крови).
- Недостаточность витамина К;
- Прием препаратов гепарина;
- Массивные гемотрансфузии (за счет плохого сохранения факторов свертывания в донорской крови);
- Присутствие волчаночного антикоагулянта;
- Тяжелые заболеваниях печени (как результат нарушения выработки факторов свертывания крови, синтезирующихся в печени);
- Антифосфолипидный синдром.

Укорочение АЧТВ - гиперкоагуляция(свидетельство активации внутреннего звена гемостаза - гиперкоагуляция и опасность развития тромбозов).

- Первая - фаза ДВС -синдрома (фаза гиперкоагуляции).
- Загрязнение пробы тканевым тромбопластином при заборе крови.

Д-димер - показатель нарушений системы свертывания крови, сопровождающихся внутрисосудистым отложением фибрина. Д-димер является продуктом распада. При ферментативном влиянии плазмина наступает разрушение белков свертывания крови фибриногена и фибрина. Д-димер образуется только при деградации фибрина, так как только продукты деградации сшитого фибрина содержат Д-димеры. Таким образом, Д-димер является специфическим продуктом расщепления поперечно-сшитого (нерастворимого) фибрина плазмином. Нормальное количество Д-димера в плазме крови не должно превышать 500 нг/л, так как превышение указанного значения говорит о чрезмерной активности процесса фибринолиза, и указывает на патологии системы гемостаза.

Содержание увеличивается

- Тромбоз артерий и вен (ТГВ и ТЭЛА).
- ДВС-синдром.
- При воспалении незначительное повышение.

- Сепсис.
- Патология печени.
- Беременность (к концу беременности значения выше в 3-4 раза, по сравнению с исходным содержанием).
- Обширные кровоизлияния.
- Инфекции.
- Прием тромболитических препаратов.
- Онкологическое заболевание.

Содержание увеличивается

- Резкое снижение при ведении гепарина.

Так же существуют случаи, когда результаты при тромбозе являются отрицательными. Возникают такие ошибки в следующих случаях

- Небольшие размеры тромба.
- Снижение фибринолитической активности при дефиците тканевого активатора плазминогена, а также при увеличении содержания ингибитора активатора плазминогена [37].

АТ (агрегация тромбоцитов) - показатель в оценке нарушений в сосудисто-тромбоцитарной фазе гемостаза. После повреждения сосуда тромбоциты накапливаются в месте повреждения, активируются и склеиваются друг с другом, образуя тромбоцитарный тромб (образование первичной гемостатической пробки), которая приводит к остановке кровотечения и заживлению раны. Во время активации тромбоцитов возникает реакция, завершающаяся активацией фосфолипазы. В результате изменяются свойства мембраны клетки из-за чего она может вступать в контакт с соседними клетками. Вследствие этого тромбоциты могут агрегировать друг с другом и образовывать тромбоцитарный тромб. Норма соответствует 25-75%.

Аномальная агрегация тромбоцитов сочетается со следующими состояниями

- Нарушения тромбоцитов, вызванные дефицитом гликопротеиновых рецепторов мембраны, дефицитом мест хранения, дефицитом высвобождения АДФ.
- Недостаток белков плазмы, обеспечивающих взаимодействие тромбоцитов со стенками сосудов, в том числе, фактора фон Виллебранда, фибриногена, фибронектина.
- Присутствие аномальных метаболитов и компонентов плазмы при уремии, диспротеинемии, синдроме диссеминированного внутрисосудистого свёртывания.
- Коллаген - сосудистые расстройства (синдром Марфана, *osteogenesis imperfecta*).
- Миелопролиферативные расстройства (эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, хроническая миелоидная лейкемия).
- Тромбастения Glanzmann's (Гланцманна): Недостаток гликопротеина IIb/IIIa; отсутствие агрегации при действии АДФ, коллагена, адреналина, тромбина, но нормальная агрегация при действии ристомицина.
- Синдром Bernard - Soulier (Бернара-Сулье): Недостаток Ib; нормальная агрегация под действием АДФ, коллагена, адреналина; недостаточная агглютинация под действием ристоцетина. В отличие от болезни фон Виллебранда агглютинация при действии ристомицина не корректируется при добавлении нормальной плазмы.
- Дефицит мест/пулов хранения (синдром Chediak- Higashi, гликогеноз типа I, синдром серых тромбоцитов, синдром Hermansky - Pudlak, синдром TAR тромбоцитопения - *Trombocytopenia/pathia with Aplasia of the Radius*), синдром Wiskott - Aldrich: агрегация тромбоцитов может быть аномальной, часто вследствие отсутствия или снижения вторичного высвобождения АДФ.
- Дефицит циклооксигеназы: Аномальная агрегация тромбоцитов в связи с неспособностью активировать путь простагландина; аспирино-подобный дефект.
- Заболевание фон Виллебранда: Нормальная агрегация при действии АДФ, коллагена, адреналина; отсутствие или снижение агглютинации при действии ристоцетина (за исключением типа IIb, где агглютинация при субнормальной концентрации ристоцетина происходит).
- Прием ацетилсалициловой кислоты, индометацина, больших доз фуросемида и как следствие снижение агрегации тромбоцитов [41].

1.4 Хемилюминесценция (как метод)

Явление хемилюминесценции - свечения, сопровождающего химические реакции, – все более широко используется в практических целях, поскольку позволяет создать ультрачувствительные и специфические методы анализа различных биологических субстратов. Хемилюминесценция (ХЛ) обусловлена, реакциями экзотермического типа и протекает, как правило, в три стадии:

1) Восстановление одного из участников реакции (присоединение электрона) и окисление второго (отрыв электрона), что приводит к запасанию химической энергии в системе, которая позднее выделится в виде фотона.

2) Перенос электрона (окислительно-восстановительная реакция) на один из более высоких энергетических уровней и образование продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии.

3) Высвечивание фотона при переходе молекулы из электронно-возбужденного в основное состояние (люминесценция). Обычно химические реакции, сопровождающиеся свечением, протекают через целый ряд промежуточных стадий, но основные этапы образования и испускания энергии сходны [10].

ХЛ метод позволяет регистрировать короткоживущие свободные радикалы, которые можно разделить на четыре группы:

- а) свободные радикалы (СР) липидов,
- б) СР активных форм кислорода,
- в) СР естественных антиоксидантов»
- г) СР, осуществляющие ферментативное дыхание в митохондриях

Впервые ХЛ лейкоцитов при фагоцитозе была обнаружена в 1972 г. С этого времени ХЛ широко используется для исследования состояния лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и лимфоцитов. Показано, что инкубация фагоцитирующих клеток с зимозаном, латексом или бактериями сопровождается усилением ХЛ, интенсивность, которой отражает функциональное состояние клеток и динамику процесса фагоцитоза.

Виды хемилюминесценции:

– Спонтанная - свечение, возникающее без вмешательства извне

1) Митогенетические (190-320 нм)

2) Метаболическое (360-1200 нм)

3) Физиологическое свечение (400-700 нм)

– Индуцированная возникает при воздействии различных факторов

1) Фотохемилюминесценция

2) Радиоллюминесценция

3) Электролюминесценция

4) Триболюминесценция

5) Термолюминесценция

ХЛ ответ при фагоцитозе характеризуется бимодальным распределением.

Первый быстрый пик имеет небольшую амплитуду и длится 4-5 секунд. Вторым подъем более медленный, отличается высокой амплитудой и достигает плато через 2-4 минуты. Бимодальность ХЛ ответа фагоцитирующих нейтрофилов связывают с выделением клетками люминолоксилирующих факторов, попадающих в реакционную среду при контактном взаимодействии активирующего агента с мембраной клетки. Вторым пик обусловлен реакцией люминола с молекулами перекиси, хлорноватистой кислоты и других кислородсодержащих продуктов, проходящих через систему фагоцита.

Повышение спонтанной и индуцированной ХЛ фагоцитов наблюдали у больных опухолями, бактериальной инфекцией, а снижение – при артритах, диабете, врожденном дефиците факторов системы комплемента. При инфекционных процессах повышение индуцированной ионами железа ХЛ фагоцитов коррелировало с увеличением содержания в мембранах конъюгированных диенов и свободных жирных кислот [10].

1.4.1 Люминол-зависимая хемилюминесценция

Измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета.

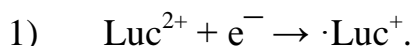
Появление и взаимодействие чужеродного материала с фагоцитирующей клеткой запускает сложный каскад физиологических и метаболических процессов, начало которого – взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с разного рода лигандами, включая иммунные комплексы, а конец – образование супероксидных радикалов при переносе электрона с НАДФН на O_2 , метаболизм этих радикалов, разрушение бактериальной клетки и запуск биосинтеза множества физиологически активных соединений в клетке-фагоците. ЛХЛ вызывается окислением люминола активными формами кислорода и хлора и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода [9].

1.4.2 Люцигенин-зависимая ХЛ как метод количественного определения супероксидных радикалов

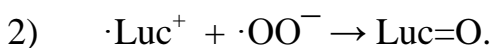
Обнаружение супероксидного радикала в живых клетках – чрезвычайно важно из-за ведущей роли этого радикала в редокс-сигнализации внутри клетки и в развитии большого числа патологических состояний. В силу высокой чувствительности люцигенина в качестве ХЛ-зонда на супероксидный радикал, люцигенин-активируемая ХЛ (Люц-ХЛ) использовалась для обнаружения $\cdot OO^-$ при окислении ксантина или гипоксантина ксантиноксидазой, НАДФН цитохром редуктазой микросом, НАДФН-оксидазой клеток-фагоцитов, и чувствительными к дифенилениодониуму НАДФН-оксидазами клеток эндотелия, фибробластов и гладко-мышечных клеток стенок кровеносных сосудов было также предложено использовать Люц-ХЛ для изучения образования $\cdot OO^-$ митохондриями в интактных клетках такая популярность метода понятна: количество биологического материала, необходимого для того, чтобы сигнал, вызванный $\cdot OO^-$, превышал фон в 10 раз при использовании

Люц-ХЛ было в 3750 раз меньше, чем при использовании предложенного Фридовичем метода, основанного на восстановлении супероксидом ацетилированного цитохрома с (Fe³⁺).

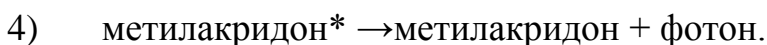
Однако, в 1993 г. Фолкнер и Фридович, а затем в 1997 г. Лёчев и Фридович высказали сомнение в возможности использовать люцигенин в качестве адекватного метода определения $\cdot\text{OO}^-$ на том основании, что в определенных условиях люцигенин может сам быть источником супероксидных радикалов в реакции его одноэлектронного окисления кислородом воздуха. Чтобы понять суть развернувшейся дискуссии, следует обратиться к схеме реакций, ответственных за хемилюминесценцию люцигенина. Первая из этих реакций – образование катион-радикала ($\cdot\text{Luc}^+$) из люцигенина, который в нейтральном водном растворе представляет собой двухвалентный катион (Luc^{2+}):



Взаимодействие катион-радикала люцигенина с супероксидом приводит к образованию нестойкого соединения – люцигенин диоксетана ($\text{Luc}=\text{O}$):



При спонтанной реакции распада $\text{Luc}=\text{O}$ образуются две молекулы N-метилакридона, одна из которых оказывается в электронно-возбужденном состоянии:



Из этой схемы следует, что скорость хемилюминесцентной реакции (3) зависит не только от концентрации $\cdot\text{OO}^-$, но и от скорости реакции одноэлектронного восстановления люцигенина (1).

В стационарных условиях скорости всех стадий равны:

$$k_1[\text{Luc}^{2+}][e^-] = k_2[\cdot\text{Luc}^+][\cdot\text{OO}^-] = k_3[\text{Luc}=\text{O}] = v. \quad (7)$$

При этом

$$I_{\text{CL}} = \eta_{\text{CL}} \cdot v. \quad (8)$$

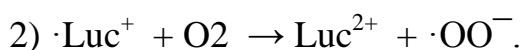
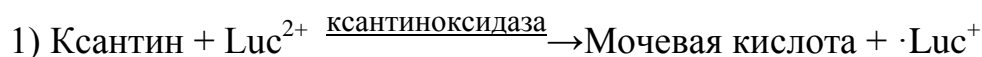
таким образом, интенсивность Люц-ХЛ пропорциональна не только концентрации люцигенина [Luc^{2+}] и супероксидного радикала [$\cdot\text{OO}^-$], но и скорости восстановления люцигенина $k_1[e^-]$, где

e^- – концентрация одноэлектронных восстановителей в системе, а

k_1 – константа скорости реакции.

Критика Люц-ХЛ как метода определения концентрации $\cdot\text{OO}^-$ основана на том, что автоокисление катион-радикала люцигенина кислородом воздуха может само по себе давать супероксидные радикалы.

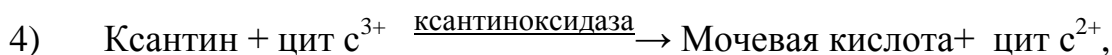
Основной аргумент в пользу такого предположения заключался в том, что восстановление цитохрома с в системе ксантин/ксантинооксидаза ускорялось люцигенином, причем это ускорение снималось СОД. Развитие событий можно представить в виде схемы:



Эта реакция, по мнению авторов, давала дополнительное (до 70%) образование супероксидного радикала по сравнению с основной реакцией:



Одновременно идет реакция:



которая конкурирует с реакцией (3), снижая продукцию супероксида.

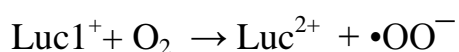
Если бы не было этой конкуренции с цитохромом с, «должно было бы наблюдаться еще большее увеличение продукции супероксида, обеспечиваемое люцигенином», пишут авторы.

Прежде всего было показано, что при низких концентрациях люцигенина (менее 20 мкМ), при которых вклад реакции (2) был незаметным (менее 20 мкМ), в различных биохимических системах наблюдалось образование супероксидных радикалов. При этом был отмечен параллелизм между тремя показателями образования супероксида: (1) интенсивность Люц-ХЛ, (2) скорость потребления кислорода, оцененная методом полярографии и (3)

образование специфического спинового аддукта при реакции $\bullet\text{OO}^-$ с ловушкой 5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пироллин-N-оксидом. Концентрации люцигенина варьировали от 1 до 5 мкМ, объектами служили ксантин + ксантинооксидаза, липоамиддегидрогеназа + НАДН, изолированные митохондрии, митохондрии в интактных клетках и НАДФН-оксидаза фагоцитов. Между интенсивностью ХЛ и зависимым от СОД восстановлением ферри- цитохрома наблюдалась прямая пропорциональная зависимость в системе ксантин + ксантинооксидаза и НАДФН-оксидазной системе фагоцитов. В двух ферментативных окислительных системах, продуцирующих H_2O_2 , а не супероксид (глюкозооксидаза + глюкоза и ксантинооксидаза + НАДН) Люц-ХЛ практически не имела места.

Авторы цитируемой работы пришли к выводу, что никакого влияния на ХЛ так называемая рециклизация люцигенина в этих случаях не оказывала. Однако они делают оговорку, что это имеет место при невысоких (менее 20 мкМ) концентрациях люцигенина в системе, подразумевая, что при более высоких концентрациях дело может обстоять иначе.

Еще более категорические возражения против роли «рециклизации» люцигенина в развитии Люц-ХЛ высказали И.Б.Афанасьев и сотрудники. Прежде всего их расчеты показали, что равновесие в обратимой реакции:



резко сдвинуто влево (константа равновесия = 106), и таким образом супероксид в реакции «рециклизации» вряд ли образуется в ощутимых количествах. С другой стороны, были получены данные, которые показали, что объяснение Лёчевым и Фридовичем их собственных результатов ошибочно. Согласно этой схеме, супероксид-радикал, образуемый в системе ксантинооксидаза (ХО) + ксантин (X) (реакция 1), восстанавливает цитохром с до двухвалентного состояния (2), что лежит в основе классического метода определения $\bullet\text{OO}^-$. При взаимодействии

$\bullet\text{OO}^-$ с люцигенином (Luc^{2+}), образуется катион-радикал ($\bullet\text{Luc}^+$), стационарная концентрация которого пропорциональна интенсивности

Люц-ХЛ. Согласно Лёчеву и Фридовичу, $\cdot\text{Luc}^+$ способен восстанавливать кислород с образованием катион-радикала (реакция 4), что и приводит к дополнительному СОД-зависимому восстановлению цитохрома³⁺ (реакция 2). Афанасьев и сотрудники объяснили данный эффект прямым восстановлением цитохрома катион-радикалом люцигенина (реакция 5). Их вывод, полученный на основании расчетов и экспериментальных данных, однозначен: люцигенин (в форме катион-радикала) участвует

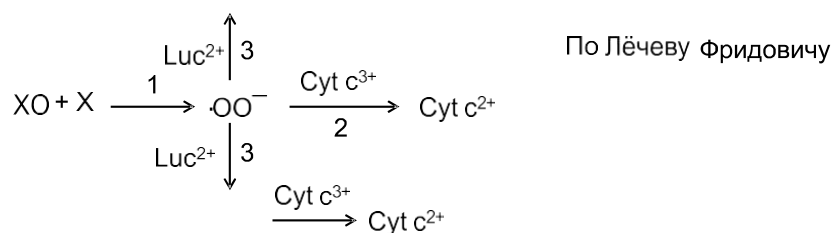


Рисунок 1 - Реакции в системе ксантин/ксантинооксидаза в присутствии люцигенина и цитохрома с

в восстановлении цитохрома с, но не в образовании дополнительного количества супероксид-радикалов. Все эти данные подтверждают адекватность ХЛ метода для определения супероксида в химических и биологических системах [10].

2 Объект и методы исследования

2.1 Объект исследования

Под наблюдением находилось 33 больных ОДП (19 мужчин и 14 женщин) средней и тяжелой степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярска. Средний возраст больных составил $46,8 \pm 6,4$ года. Из исследования были исключены больные с ОДП легкой степени и, у которых ОДП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [60]. Для оценки тяжести ОДП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе [43]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [61]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [62]. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Объектом исследования явились нейтрофильные гранулоциты периферической крови больных острым панкреатитом. Оценку состояния здоровья и забор крови производили на базе Красноярского краевого центра крови №1. 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 Методика оценки фагоцитоза

Функции фагоцитоза лимфоцитов оценивали с помощью бактерий стафилококка двух штаммов (MRSA, MSSA) меченых FITC на проточном цитометре FC500. Конъюгацию бактерий проводили следующим образом: смывы с твёрдых сред разводили бикарбонатным буфером pH=9,0 до концентрации 1млн/мл, затем в равном объёме добавляли FITC растворенный в ДМСО(1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течении 1 часа, и троекратно отмывали. К 50 мл венозной гепаринизированной крови добавляли 5 мкл меченых бактерий и инкубировали 30 минут при температуре 37°C, затем отмывали и докрасивали моноклональными АТ. Далее по прошествии 15 минут проводили лизис эритроцитов раствором Versalise. Через 15 мин. определяли интенсивность флюоресценции на проточном цитометре.

2.3 Определение хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови

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 с последующей очисткой от прилипающих клеток. Количество лимфоцитов подсчитывали в камере Горяева. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определялась чистота выхода нейтрофилов, которая составляла не менее 97%, жизнеспособность клеток соответствовала 98-100%.

Исследовали хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина (“Sigma”, США) в концентрации 10⁻⁵ М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной

хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хенкса – 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 (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ($S_{инд.}/S_{спонт.}$) 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:

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

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

$S_{спонтанная}$ – величина площади под кривой хемилюминесценции не индуцированная (относительных единиц);

Уровень фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченного (fluorescein isothiocyanate) стафилококкового белка А [44]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, рН=9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 часа, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию белка до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченного белка А и инкубировали 30 минут при температуре 37 оС. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman

Coulter, США). Для гашения адгезированного на поверхности нейтрофилов FITC-меченного белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 50000 нейтрофилов. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ).

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [45]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции ($S_{инд.}$) к площади спонтанной ($S_{спонт.}$) и определяли как индекс активации ($S_{инд.}/S_{спонт.}$).

У всех обследованных на анализаторе «STA-COMPACT» (Швейцария) исследовались следующие показатели коагуляционного гемостаза: протромбиновый индекс (ПТИ), содержание фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), уровень Д-димера, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбина III (АТ III). На агрегометре «LA230-2 БИОЛА» (Россия) изучались показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза: спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ) и индуцированная, с применением в качестве индукторов аденозин-дифосфата (АДФ) в дозах 0,1 мкМ и 5 мкМ и адреналина в дозе 10 мкг/мл.

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 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (Q1 и Q3). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

3 Результаты и обсуждение

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ - аденозиндифосфат

АТ III - антитромбина III

АТ с АДФ - индуцированная агрегация тромбоцитов с аденозиндифосфат

АТ с адреналином - индуцированная агрегация тромбоцитов с адренолином

АФК - активные формы кислорода

АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время

ДВС-синдром - синдром дессименированного внутрисосудистого свертывания крови

ИА - индекс активации

ИД - иммунодефицит

ИЛ-1 - интерлейкин-1

ИЛ-6 - интерлейкин-6

ИЛ-8 - интерлейкин-8

ИФА- иммуноферментный анализ

КТ - компьютерная томография

ЛПС - липополисахарид

ЛХЛ - люминол-зависимая хемилюминесценция

Люц-ХЛ - люцигенин-зависимая хемилюминесценция

НАД - никотинамиддинуклеотид окисленный

НАДН - никотинамиддинуклеотид восстановленный

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

НСТ - нитросиний тетразолий

ОДП - острый деструктивный панкреатит

ПТИ - протромбиновый индекс

ПОН – полиорганная недостаточность

РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы

САТ - спонтанная агрегация тромбоцитов

СР - свободные радикалы

ССВР - синдром системной воспалительной реакции

ТГВ - тромбоз глубоких вен

ТЭЛА - тромбоэмболия легочной артерии

ФИ - фагоцитарный индекс

ФЧ - фагоцитарное число

ФНО- α - фактор некроза опухоли α

ХЛ - хемилюминесценция

CARS - компенсаторный противовоспалительный ответ

Tmax - время выхода на максимум

Imax - максимальное значение интенсивности

S – площадь под кривой

Синд/Сспонт - отношение площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Фагоциты, фагоцитоз [электронный ресурс]: «Иммунология и биохимия» – Режим доступа: <http://biohimik.net/vrozhdennyj-immunitet/fagotsity-fagotsitoz>.
2. Картина белой крови [электронный ресурс]: Файловый архив студентов «StudFiles» – Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/1154428/>.
3. Табл. 304.1(Harrison). Причины острого панкреатита [электронный ресурс]: База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har3/00339141.htm>.
4. Острый панкреатит: краткие сведения [электронный ресурс]: База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har3/002379df.htm>.
5. Хронический панкреатит: этиология [электронный ресурс]: База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har3/003d4776.htm>.
6. Самусев Р. П., Общая и частная гистология: полный конспект лекций./ Р. П. Самусев. – Оникс, 2010. –5 с.
7. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник.: учебник / А. А. Ярилин. – ГЭОТАР-Медиа – 2010. –52 с.
8. Дранник Г. Н., Клиническая иммунология и аллергология. / Г. Н. Дранник. – Одесса: «АстроПринт». –1999. – 595 с.
9. Владимиров, Ю. А., Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция/ Владимиров, Ю. А., Проскурнина Е.В.// Успехи биологической химии. - 2009. - т. 49. - 341–388 с.
10. Владимиров, Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях /. Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - № 1. - 16-23 с.

11. Лоранская И.Д., Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология / Лоранская И. Д., Батюхно Т. А., Субботина О. А. // Глобал медиа технологии (Москва). -2008. - 18-23 с.
12. Острый панкреатит: течение [электронный ресурс]: База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har3/0023af6c.htm/>
13. Ершов А.В., Проявления вторичного иммунодефицита у пациентов с острым деструктивным панкреатитом / Ершов А.В., Долгих В.Т., Долгих Т.И., Орлов Ю.П., Рейс А.Б. // Медицинская иммунология - 2012. - №6. - 549-554 с.
14. Винник Ю. С., Результаты исследования иммунного статуса больных различными формами острого / Винник Ю. С., Булыгин Г.В., Дунаевская С.С. // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2002. – т. 32. - № 3. - 50–54 с.
15. Гарипов Р.М., Острый деструктивный панкреатит: иммунологические аспекты в диагностике и лечении / Гарипов Р.М., Гайсина З.Р.// Медицинский вестник Башкортостана - 2010.- №4. - 55-56 с.
16. Дибиров М.Д., Применение электромагнитного излучения миллиметрового диапазона для регуляции процессов протеолиза и иммунитета при остром панкреатите/ Дибиров М.Д., [и др.] // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2010. – №1. –78-83 с.
17. Чупахин О. Н., Коррекция системной воспалительной реакции при остром панкреонекрозе / Чупахин О. Н., Юшков Б. Г., Ранцев М. А.// Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2012. - №7. – 35 – 39 с.
18. Агапов М.А., Цитокин-антагонистическая терапия в комплексном лечении острого деструктивного панкреатита: возможности и перспективы./ Агапов М.А., Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Ованесян Э.Р., Леоненко И.В., Индароков В.А., Никонова А.С., Греченко В.В., Горский

- В.А.// Хирургия. приложение к журналу CONSILIUM MEDICUM. – 2010. -№1. –43-46 с.
19. Власов А.П., Цитокиновый профиль больных с тяжелой хирургической патологией./ Власов А.П., Радайкина О.Г., Власов П.А., Шевалаев Г.А., Болотских В.А., Мелешкин А.В.// Современные проблемы науки и образования – 2015. - №2-3. – 212 с.
20. Салиенко С.В., прогнозирование течения острого деструктивного панкреатита на основании динамики показателей цитокинового баланса/ Салиенко С.В. // Современные наукоемкие технологии. - 2015. - №3. –100-102 с.
21. Козлов, В.К., Иммунопатогенез сепсиса: диагностические и лечебные стратегии [электронный ресурс]: презентация, Козлов, В.К.. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет, 2014 – Режим доступа :http://www.arfpoint.ru/wp-content/uploads/2014/05/Kozlov_immunopatogenez-sepsisa.pdf.
22. Новиков, С.В., Статистика панкреатита [электронный ресурс]: – Москва НИИ СП им.Н.В.Склифосовского, 2013 – Режим доступа: <http://pancreonecrosis.ru/statistika-pankreatita/>
- 23.Савченко А.А., Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом / Савченко А.А., [и др.] // Цитокины и воспаление. –2013. –Т. 12, № 1-2.– 115-119 с.
24. Шкапова Е.А., Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки / Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2010.–Т. 149, № 2.– 201-203 с.
- 25.Гемостаз: общие сведения [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har/00173e8b.htm>.

26. Гемостаз сосудисто-тромбоцитарный: общие сведения [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har/0016eb42.htm>.
27. Тромбоциты: адгезия и начальная агрегация [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/physiology/0012b702.htm>.
28. Тромбоциты: активация [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/physiology/00164c7a.ht>.
29. Что такое протромбиновый индекс и его норма [электронный ресурс] : «Пробирка» – Режим доступа: <http://www.probirka.org/biblio/polezno/5545-cto-takoe-protrombinoviy-indeks-i-ego-norma.html>.
30. Клиническое значение анализа на фибриноген для практической медицины [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/stm/fibrinogen.htm>.
31. Фибриноген (в крови) [электронный ресурс] : «Столица Медкл» – Режим доступа: <http://old.smed.ru/guides/diagnostics/DI546/DI547/DI48/316#article>.
32. Фибрин-мономерные комплексы (РФМК) – показатели нормы, причины отклонения от нормы [электронный ресурс] : Расшифровка медицинских анализов «AnalyzeOnline.ru» – Режим доступа: <http://analizonline.ru/rfmk.html>.
33. Анализ РФМК: норма и отклонения [электронный ресурс] : «Boleznikrovi.com» – Режим доступа: <http://boleznikrovi.com/analizy/svertyvaemost/rfmk-norma.html#section-2>.
34. Расшифровка анализа коагулограммы [электронный ресурс] : «Krov Expert» – Режим доступа: <https://krov.expert/analiz/biohimicheskij/rasshifrovka-koagulogrammy.html>.
35. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) – показатели нормы, причины отклонения от нормы [электронный ресурс]:

- Расшифровка медицинских анализов «AnalyzeOnline.ru» – Режим доступа: <http://analizonline.ru/achtv.html>.
36. Антитромбин III [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har/0007961c.htm>.
37. Д-Димер (в крови) [электронный ресурс] : «Smed.ru» – Режим доступа: <https://www.smed.ru/guides/321#article/>.
38. Антитромбин III (в крови) [электронный ресурс] : «Столица Медкл» – Режим доступа: <http://old.smed.ru/guides/diagnostics/DI546/DI547/DI48/47718/#article>.
39. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (в крови) [электронный ресурс] : «Столица Медкл» – Режим доступа: <http://old.smed.ru/guides/diagnostics/DI546/DI547/DI48/309/#article>.
40. Тромбиновое время (в крови) [электронный ресурс] : «Столица Медкл» – Режим доступа: <http://old.smed.ru/guides/diagnostics/DI546/DI547/DI48/314/#article>.
41. Агрегация тромбоцитов [электронный ресурс] : «Smed.ru» – Режим доступа: <https://www.smed.ru/guides/307#article.55>
42. Гемостаз коагуляционный: общие сведения [электронный ресурс] : База знаний по биологии человека «Humbio» – Режим доступа: <http://humbio.ru/humbio/har/0016d0ba.htm>.
43. Багненко С.Ф., Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечение) / С.Ф. Багненко [и др.] // Анналы хирургической гепатологии.–2006.–Т. 11, № 1.– 60-66 с.
44. Мазуров Д.В., Применение проточной цитометрии для оценки поглотительной и бактерицидной функций гранулоцитов и моноцитов периферической крови / Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. // Аллергия, астма и клиническая иммунология.–1999.–№ 9.– 154-156 с.
45. Шкапова Е.А., Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки /

- Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.–2010.–Т. 149, № 2.– 201-203 с.
46. Maheshwari, R. Severe Acute Pancreatitis and Necrotizing Pancreatitis/ R. Maheshwari, R.M. Subramanian // Crit. Care Clin. – 2016. - Vol. 32. - № 2, P. 279-290.
47. Lisman, T. Activation and regulation of hemostasis in acute liver failure and acute pancreatitis/ T. Lisman, R.J. Porte // Semin. Thromb. Hemost. – 2010. - Vol. 36. - № 4. - P. 437-443.
48. Vinokurov, M.M. Immunomodulation and treatment of acute destructive pancreatitis in a multidisciplinary surgical hospital / Vinokurov M.M. et al // Wiad. Lek. - 2015. - Vol. 68. - № 4. - P. 582-586.
49. Singh, P. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding/ Singh P., Garg P.K. // Indian J. Gastroenterol., - 2016. - Vol. 35. - №. 3. - P. 153-166.
50. Andreassen, S.M. mRNA expression of genes involved in inflammation and haemostasis in equine fibroblast-like synoviocytes following exposure to lipopolysaccharide, fibrinogen and thrombin/ Andreassen S.M et al // BMC Vet. Res. - 2015. - Vol. 11. - P. 141.
51. El-Benna, J. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. Immunol / El-Benna J. et al // Rev. - 2016. - Vol. 273. - №1, P. 180-193.
52. Hoppe, B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation / Hoppe B // Thromb. Haemost. – 2014. -Vol. 112. - №4. - P. 649-658.
53. Iba, T. Antithrombin supplementation and risk of bleeding in patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation / Iba T. et al // Thromb. Res. – 2016 - Vol. 145. - P. 46-50.
54. Kovács, I. Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes / Kovács I. et al // Free Radic. Res. – 2014. - Vol. 48. - № 10, P. 1190-1199.

55. Okamura, D. Age-dependent vulnerability to experimental acute pancreatitis is associated with increased systemic inflammation and thrombosis / Okamura D. et al // *Aging Cell.* – 2012. - Vol. 11. - № 5, P. 760-769.
56. Trujillo, M. Analysis of the Immunity-Related Oxidative Bursts by a Luminol-Based Assay/ Trujillo M. // *Methods Mol. Biol.* – 2016. - Vol. 1398. - P. 323-329.
57. van Bijnen S.T. Neutrophil activation and nucleosomes as markers of systemic inflammation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: effects of eculizumab / van Bijnen S.T. et al // *J. Thromb. Haemost.* – 2015. - Vol. 13. -№ 11. - P. 2004-2011.
58. Yasuda, N. The efficacy and safety of antithrombin and recombinant human thrombomodulin combination therapy in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation / Yasuda N. et al // *J. Crit. Care.* – 2016. - Vol. 36. - P. 29-34.
59. Zonneveld, R. Measurement of functional and morphodynamic neutrophil phenotypes in systemic inflammation and sepsis / Zonneveld R., Molema G., Plötz F.B // *Crit. Care.* -2016. - Vol. 20. - P. 235.
60. Le Gall, J.-R. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study / Le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F // *JAMA.* – 1993. - Vol. 270. - P. 2957-2963.
61. Vincent, J.L. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine / Vincent J.L. et al // *Intensive Care Med.* – 1996. -Vol. 22. - № 7. -P. 707-710.
62. Bone R.S. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis / Bone R.S et al // *Crit. Care Med.* – 1992. - Vol. 20. - №6. -P. 864-874.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.К. Шишацкая

подпись

« 23 » июня 20 17 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Состояние метаболизма и интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов
при остром панкреатите

Руководитель



Профессор, д.м.н.

Савченко А.А.

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

ББ13-01Б

041313237

28.06.17


Иванюшина Е.А.

номер группы

номер зачетной книжки

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск

2017