

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


АКТИВНОСТЬ NAD (NADP) ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В НЕЙТРОФИЛАХ
КРОВИ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ В
ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Руководитель

 26.06.17
подпись, дата

профессор А.А. Савченко

Выпускник

 26.06.17
подпись, дата

Д.Т. Азахов

Красноярск 2017

Содержание

Введение.....	3
1 Обзор литературы	4
1.1 Перитонит	4
1.1.1 Классификация перитонита.....	4
1.1.2. Диагностика перитонита.....	5
1.1.3. Течение перитонита	6
1.1.4. Лечение распространенного гнойного перитонита.	8
1.2 Нейтрофилы	9
1.3 Функции и метаболизм нейтрофилов при различных воспалительных процессах.....	11
2. Материалы и методы	14
2.1 Объект исследования	14
2.2 Выделение нейтрофилов.....	14
2.3 Определение хемилюминесцентной реакции гранулоцитарных нейтрофилов.....	15
2.4 Биолуминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ гранулоцитарных нейтрофилов	15
2.5 Статистические методы исследования.....	19
3 Результаты исследований и их обсуждение	20
3.1 Результаты хемилюминесцентной реакции НГ	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Результаты определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в НГ и их зависимости от хемилюминесцентной активности.....	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список сокращений	21
Список используемой литературы	22

Введение

До сегодняшнего дня остается актуальной проблема лечения перитонита в связи с высокой летальностью при данной патологии. Генерализация инфекции является основным осложнением и неблагоприятным прогностическим признаком, ведущим к полиорганной недостаточности. Рациональная антибактериальная терапия и оптимальное хирургическое вмешательство не всегда приводят к положительному результату [1,2,14,20,21].

Исход заболевания определяется как исходным состоянием организма, так и изменениями, происходящими в системе иммунитета [19]. Первыми в воспалительные, а так же иммунные процессы вовлекаются нейтрофилы, обуславливая тем самым пусковые механизмы развития воспаления и ранние защитные реакции. Исследование метаболических изменений, в частности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов может обеспечить улучшение диагностики иммунных нарушений, оценки прогноза течения заболевания и правильного выбора объема интенсивной терапии. [3,4,8,9]

Целью данной работы является определение активности NAD (NADP)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови при распространенном гнойном перитоните.

Задачи:

1. Исследовать особенности хемилюминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов при перитоните;
2. Определить активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах у больных перитонитом;
3. Провести корреляционный анализ ферментативной и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных перитонитом.

1 Обзор литературы

1.1 Перитонит

Перитонит (лат. peritoneum брюшина + лат. -itis суффикс, указывающий на воспаление) — воспаление париетального и висцерального листков брюшины, которое сопровождается интоксикацией и выраженными местными изменениями. Особенностью этой патологии является особая форма ответа организма на контакт патогенного агента с серозной оболочкой, которая сопровождается тяжелыми общими симптомами заболевания, ведущим к выраженным, зачастую необратимым поражениям жизненно важных органов и систем [5,6,7].

1.1.1 Классификация перитонита

До настоящего времени было предложено много различных вариантов классификации перитонита (по патологоанатомическим признакам, по степени распространенности и т.д.). Учитывая практические предназначения, в основе клинической классификации используется ряд признаков.

По этиологии перитонит подразделяется на:

1) первичный или спонтанный бактериальный перитонит – это редкая форма перитонита с гематогенной диссеминацией микроорганизмов в брюшинный покров без нарушения целостности полых органов (составляет 1-5 %)[35].

2) вторичный перитонит – является наиболее частой формой, развивающейся в результате деструкций или травм органов брюшной полости. 80% случаев возникает, в следствии, перфораций и деструктивных поражений органов брюшной полости; 20% - в результате различных абдоминальных операций, а так же закрытых травм и проникающих ранений органов брюшной полости.

3) третичный (перитонит без манифестирующего источника инфекции) – представляет особую сложность в диагностике и лечении, это рецидивирующая и персистирующая форма перитонита, которая развивается при критическом состоянии пациента когда наблюдается угнетение механизмов местной и системной противоинфекционной защиты.

По характеру экссудата выделяют:

- 1) серозный;
- 2) серозно-фиброзный;
- 3) фибринозно-гнойный;
- 4) гнойный;
- 5) желчный;
- 6) каловый;
- 7) геморрагический.

По распространенности воспалительного процесса перитонит подразделяется на:

- 1) местный (отграниченный, неотграниченный);
- 2) распространенный (разлитой) [6,25,26].

1.1.2. Диагностика перитонита

Диагностика перитонита должна быть комплексной и включать клинические симптомы, лабораторные и инструментальные данные. В настоящее время приоритетными считаются методы объективной диагностики с применением в сомнительных случаях лапароцентеза, лапароскопии и пункционных исследований (в показанных случаях) под контролем УЗИ и КТ. Эти методы направлены на выявления выпота в брюшной полости, его анализ и определение сопутствующей перитониту динамической кишечной непроходимости. Так же используется метод обзорной рентгенографии органов брюшной полости, позволяющий выявить

признаки перфорации полых органов, свободную жидкость в брюшной полости, непроходимость кишечника.

Вид бактериальной флоры часто определяет клиническое течение и исход заболевания. Поэтому большое значение имеет бактериологическое исследование микрофлоры с определением ее чувствительности к антибиотикам.

Определенную сложность вызывает диагностика послеоперационного перитонита. Нужно учитывать факт прогрессирующего или внезапного ухудшения состояния больного, отсутствие тенденции к его улучшению при адекватной интенсивной терапии, а так же неподдающийся медикаментозной и физиотерапевтической стимуляции парез кишечника. Затруднения могут возникнуть в начальной стадии заболевания за счет преобладания симптомов основного заболевания или травмы, ставшими источником перитонита. Существенные сложности может представить диагностика перитонита у лиц старческого возраста, так как в результате снижения реактивности организма объективные признаки болезни (мышечная защита, гипертермия, лейкоцитоз) и болевые ощущения могут быть слабо выраженными.

Не представляет серьезных затруднений диагностика перитонита в стадии субкомпенсации и декомпенсации, но лечение перитонита на этих стадиях зачастую оказывается малоэффективным [6,7,25].

1.1.3. Течение перитонита

В последнее время клинические проявления перитонита значительно изменились. Это связано с атипичностью его течения в разных фазах. На фоне вторичных иммунодефицитов (у ослабленных больных, у пациентов при тяжелой сопутствующей патологии, в старческом возрасте) наблюдается стертость классических симптомов перитонита. Значительные изменения клиники заболевания связано с применением современных

антибактериальных средств и других химических веществ (иммуномодуляторов и др.).

Перитонит характеризуется течением 3 стадий:

- 1) компенсации;
- 2) декомпенсации;
- 3) полиорганной недостаточности.

В 1 фазе, для борьбы с микробами и токсинами, происходит активная мобилизация всех защитных механизмов организма: экссудация, стимуляция иммунных процессов, ограничение воспалительного очага выпадающим фибрином, сорбирующим токсические вещества. И при надлежащей терапии приводит либо к выздоровлению, либо к полному отграничению воспалительного очага. Изредка больные могут погибнуть от «первичного» шока. При неблагоприятных условиях процесс из 1 фазы переходит во 2.

Во 2 фазе перитонита напряженность иммунитета снижается, микробы интенсивно размножаются, в том числе кишечная палочка, происходит накопление большого количества эндотоксинов. Что ведет к выраженной интоксикации. Наблюдается централизация кровообращения, что приводит к ишемической аноксии, быстро превращающейся в стойкую аноксию с секвестрацией значительного количества крови, уменьшением объема циркулирующей крови. Патологический процесс усугубляется за счет тканевой гипоксии, ведущей к серьезным ферментативным расстройствам. Все это приводит к нарушениям функций жизненно важных органов (печени, почек, легочной и сердечно-сосудистой систем). После того как изменения становятся необратимыми начинается 3 фаза перитонита.

Фаза полиорганной недостаточности отличается истощением защитных механизмов и значительным нарушением метаболизма вместе с прогрессированием тяжелой интоксикации. Белковая недостаточность и гиповолемия вызываются резким усилением процессов катаболизма и большими «безвозвратными» потерями белка и внеклеточной жидкости с гнойным экссудатом, рвотными массами и в просвете кишечника.

Происходит нарушение водно-электролитного, углеводного и жирового обмена. Прогрессирующая интоксикация, гиповолемия, нарушение метаболизма и функционального состояния паренхиматозных органов ведет к смене гипердинамического состояния ССС гиподинамическим, что характеризуется прогрессирующим падением сердечного и ударного индексов с развитием синдрома «малого сердечного выброса» [6,7,14,25,29].

Таким образом, в каждой фазе распространенного гнойного перитонита (РГП) можно выделить ведущие патогенетические звенья, что важно для определения объема и характера лечебных мероприятий.

1.1.4. Лечение распространенного гнойного перитонита.

Перитонеальный сепсис и высокая летальность при РГП по-прежнему являются значительной проблемой не смотря на усовершенствования хирургических методов лечения и применение мощных антибактериальных средств.

Количество умерших от РГП зависит от длительности заболевания и возрастает по мере прогрессирования и распространения воспалительного процесса в брюшной полости. «Синдром множественной дисфункции органов» одна из основных причин смерти больных в послеоперационном периоде, развивающийся, несмотря на адекватную хирургическую санацию первичного очага и коррекцию гемодинамических и дыхательных расстройств [15].

Центральным звеном лечения является хирургическая операция, обеспечивающая устранение очага воспаления, интраоперационную санацию и рациональное дренирование брюшной полости. При необходимости проводится интубация кишечника.

Антибактериальная терапия является неотъемлемой частью лечения перитонита и начинается как можно раньше, еще до оперативного

вмешательства наиболее эффективными антибиотиками или их комбинацией. Далее, при получении результатов антибиотикочувствительности микрофлоры, в терапию необходимо внести коррективы.

Интенсивная терапия включает борьбу с эндотоксическим и бактериальным шоком, синдромом множественной дисфункции органов, гиповолемией, нарушениями свертывающей системы крови, водно-электролитного баланса и белковым дефицитом [1,6,7,25].

1.2 Нейтрофилы

Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты, или нейтрофилы) составляют значительную часть белых клеток крови в количестве $2,0- 5,5 \cdot 10^9$ кл/л крови (48-78% от общего числа лейкоцитов у человека). Также в крови могут находиться юные нейтрофилы (до 0,5% или вообще отсутствовать) и 1-6% палочкоядерных форм нейтрофилов, не завершивших свое созревание [8,13,27,28].

Нейтрофильные гранулоциты образуются в костном мозге из полипотентных стволовых клеток, поступают в кровяное русло в виде высокодифференцированных зрелых фагоцитов, откуда через 4-10 часов мигрируют в ткани. Основным пулом зрелых нейтрофилов является костный мозг и пристеночное положение в кровеносных сосудах.

Ядро зрелого нейтрофила имеет 3-5 сегментов, соединенных тонкими перемычками. Эухроматин располагается в центре, а гетерохроматин занимает широкую зону по периферии ядра. Для юных нейтрофилов характерно бобовидное ядро, а для палочкоядерных – S-образное, в виде подковы или изогнутой палочки.

В цитоплазме содержатся нейтральные (по данным окрашивания) гранулы, а также комплекс Гольджи, гранулярная эндоплазматическая сеть, единичные митохондрии. Число зерен варьирует от 50 до 200[28].

Таблица 1 Свойства гранул нейтрофилов

Разновидность гранул	Состав гранул	Функциональное назначение содержимого
Специфические (вторичные)	NAGPH-оксидаза, лактоферрин, щелочная фосфатаза, лизоцим, коллагеназа и т.д.	Быстрая фаза бактериолиза
Азурофильные (первичные)	Миелопероксидаза, кислые гидролазы, лизоцим, дефензины, нейтральные протеазы (серпроцидины), гранулофизин и т.д.	Медленная фаза бактериолиза
Желатиназные (третичные)	Желатиназа	Обеспечение миграции
Секреторные везикулы	Щелочная фосфатаза	Взаимодействие с микроокружением

Зернистость и органеллы отсутствуют в поверхностном слое цитоплазмы. Расположенные здесь гранулы гликогена, актиновые филаменты и микротрубочки, обеспечивают образование псевдоподий для движения клетки. За счет сокращения актиновых филаментов нейтрофил передвигается по соединительной ткани [8,13,27,28,32].

В нейтрофилах выделяют следующие типы гранул: первичные (азурофильные), вторичные (специфические), третичные (желатиназные) и секреторные везикулы (таб. 1). Азурофильные гранулы (лизосомоподобные) составляют 10-20% всей популяции гранул и содержат ферменты активные при кислых значениях pH (миелопероксидазу, набор разнообразных гидролитических ферментов, катионные белки, лизоцим,

гликозаминогликаны). Специфические гранулы, более мелкие и многочисленные (80-90 % всех гранул), содержат ферменты активные при нейтральных и слабощелочных значениях pH: лактоферрин, щелочную фосфатазу, лизоцим, белок ВР1, связывающий витамин В12, а так же большое количество NADPH-оксидазы (катализирует «кислородный взрыв» и образование активных форм кислорода (АФК)). Желатиновые (третичные) гранулы содержат желатиназу, позволяющую преодолевать базальные мембраны. Секреторные везикулы — содержат щелочную фосфатазу (высвобождается при активации нейтрофилов в первую очередь) [8,13,27,28]. На поверхности нейтрофилов экспрессируются множество рецепторов: CD13 - аминопептидаза N, рецептор для ряда вирусов; CD14 - рецептор для липополисахарида (ЛПС); Fc-рецепторы (FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16)); p2-интегрины (LFA-1, Mac-1 и p155/95); рецепторы для компонентов комплемента (CR1, CR3 и CR4); рецепторы для хемотаксических факторов (C3aR, C5aR, рецептор для лейкотриена B4); молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC-I, при активации - MHC-II); цитокиновые рецепторы для G-CSF (основной фактор регулирующий развитие нейтрофилов), а так же для GM-CSF, IL-3, IL-17; хемокиновые рецепторы (SDF-1 (CXCR4) - определяют связь нейтрофилов с тканями, IL-8 (CXCR1, CXCR2) - основной хемотаксический фактор) [8,23].

1.3 Функции и метаболизм нейтрофилов при различных воспалительных процессах

Нейтрофильные гранулоциты являются звеном врожденного иммунитета (формируют первую линию защиты) и в первую очередь, направлены на уничтожение патогена, а также ограничения его распространения. Кроме того, по последним данным, нейтрофилы регулируют иммунный ответ и воспаление [4,8,17,21,23,34].

Проявлением активации нейтрофилов являются некоторые изменения метаболизма, повышение фагоцитарной активности и эффективности фагоцитоза, «кислородный взрыв» и накопление свободных радикалов[10,11,22,37].

Выделяют 8 стадий фагоцитоза:

1) хемотаксис - приближение к объекту фагоцитоза, определяемое присутствием градиента хемотаксинов, химических факторов и хемоаттрактантов;

2) адгезия – обусловлена присутствием меточных рецепторов для молекул области фагоцитоза;

3) активация мембраны – деполяризация, поступление в клетку Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , повышение уровня цАМФ;

4) погружение – инвагинация мембраны;

5) образование фагосомы;

6) образование фаголизосомы - слияние фагосомы и лизосомы;

7) киллинг и расщепление объектов фагоцитоза;

8) выброс продуктов деградации [4,8,13,33].

Нейтрофилы имеют большое количество рецепторов, которые позволяют дифференцированно реагировать на малейшие изменения иммунного гомеостаза и работают как биологические сенсоры, опосредуя взаимосвязь нейтрофилов с экстрацеллюлярным окружением[8,23,38]. Пул рецепторов сохраняется внутриклеточно на мембране гранул и секреторных везикул, а под воздействием активаторов транслоцируется на поверхностную мембрану клетки[23].

Нейтрофильные гранулоциты способны генерировать активные формы кислорода и хлора за счет высокого содержания в них NADPH-оксидазы и миелопероксидазы (МП), тем самым осуществляя внутрифагосомальный киллинг. [10,12,33]. С другой стороны генерация большого количества АФК ведет к токсическому повреждению окружающих тканей и некоторых клеток иммунной системы, например, Т-лимфоцитов. Вторичные нарушения

активности NADPH-оксидазы ведут к нарушению микробицидной активности фагоцитов и развитию пиогенных и микобактериальных инфекций [22,23,36,37,39].

Внеклеточный киллинг микроорганизмов нейтрофилы осуществляют посредством нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET). NET формируются путем сложных морфологических перестроек в клетке, касающихся, прежде всего ядра. Нейтрофилы погибают через NETosis – активная клеточная смерть, значительно отличающаяся от апоптоза и некроза по морфологическим и молекулярным критериям. Она зависит от наработки АФК через активацию NADPH-оксидазы. Широкое разнообразие патогенов может вызвать и/или быть убитыми NET: бактерии, грибы, простейшие паразиты и даже вирусы (в том числе ВИЧ1) [23].

Функциональная активность нейтрофилов обеспечивается за счет ферментов внутриклеточного метаболизма. Наиболее информативными показателями внутриклеточного метаболизма являются оксидоредуктазы. АФК (в частности супероксид-аниона - O_2^-) образуются, в следствии, взаимодействия НАДФН с молекулой кислорода при участии NADPH-оксидазы [16,18,20]. Поступление НАДФН происходит при расщеплении глюкозы по механизму гексозомонофосфатного шунта. Ферментом, инициирующим ключевую реакцию пентозофосфатного цикла, является Г6ФДГ (катализирует дегидрирование глюкозо-6-фосфата и кофермента НАДФ)[16,24]. Примерно 50% потребности организма в НАДФН покрывается за счет пентозофосфатного цикла, остальные 50% – в других реакциях, таких как:



2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы г. Красноярска обследовано 18 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30 – 65 лет (средний возраст пациентов составил $49,6 \pm 9,4$ лет). Из исследования исключали больных перитонитом, развившимся вследствие деструктивного панкреатита, мезентериального тромбоза, злокачественных новообразований брюшной полости IV стадии. При формулировке диагноза использовали классификацию, предложенную Савельевым В.С. с соавт. (2000 г.). Окончательное подтверждение диагноза осуществлялось интраоперационно.

Забор крови для исследования ферментативной и хемилюминесцентной активности нейтрофилов при РГП производили перед операцией (1 день). В качестве контроля обследовано 40 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

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 Выделение нейтрофилов

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения лимфоцитов,

$\rho=1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофилов. Концентрацию подсчитывали в камере Горяева.

2.3 Определение хемилюминесцентной реакции гранулоцитарных нейтрофилов

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50мкл люцигина для определения интенсивности синтеза супероксид радикала или люминола для определения интенсивности суммарного синтеза активных форм кислорода (“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 Хэнкса – для индуцированной. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL3606” (СКТБ “Наука”, Красноярск). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{\max}), максимальное значение интенсивности (I_{\max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции, характеризующую суммарный синтез активных форм кислорода за 90 минут исследования. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ($S_{\text{инд.}}/S_{\text{спонт.}}$) и определяли как индекс активации (ИА).

2.4 Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ гранулоцитарных нейтрофилов

Билюминесцентное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ проводилось по ранее разработанным методикам (Савченко А.А., Сунцова Л.Н., 1989; Савченко А.А., 1991).

Таблица 2 – Концентрация субстратов, кофакторов и показатели pH среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах биолюминесцентным методом

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

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

Для этого суспензию выделенных нейтрофилов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса с добавлением дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола. Затем производили непосредственное определение активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. Для этого в 150 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносили 50 мкл суспензии разрушенных нейтрофилов. Конкретные значения

концентраций субстратов и кофакторов, а также рН среды для определяемых ферментов представлены в табл. 1. Необходимо отметить, что в инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли АДФ в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно. В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH_4Cl в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР – ЭДТА в концентрации 0,5 мМ.

После инкубации исследуемых проб при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением $\text{НАД}(\text{Ф})^+$) или 5 минут (для реакций с окислением $\text{НАД}(\text{Ф})\text{Н}$) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}\text{М}$, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида и 10 мкл ферментативной системы $\text{НАД}(\text{Ф})\text{Н}:\text{ФМН}$ оксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+, Na^+ -фосфатном буфере с рН 7,0). После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра “БЛМ-8803” (сконструирован в СКТБ “Наука”, г. Красноярск) производили измерение свечения.

Ферментативная система $\text{НАД}(\text{Ф})\text{Н}:\text{ФМН}$ -оксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН г.Красноярска (Тюлькова Н.А., Антонова Э.В., 1991).

Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, нами определялись показатели, условно названные “субстратный фон ферментов”.

Определение производили в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносили буфер. В результате измерения свечения на биолюминометре получают относительные значения

активности исследуемых ферментов. Чтобы получить абсолютные значения активности необходимо построить график зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9} – 10^{-4} М вносили в кювету биолюминометра, содержащие биолюминесцентные реактивы в концентрациях указанных выше, после чего производилось измерение интенсивности биолюминесценции. В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы (Тюлькова Н.А., Антонова Э.В., 1991), калибровочные графики строились для каждого рН буфера.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ рассчитывали по формуле:
$$\frac{\Delta[C] \times V \times 10^6}{T}$$

где $\Delta[C]$ – разница концентраций НАД(Ф)Н в пробах “фермент” и “фон фермента”;

V – объем пробы в миллилитрах;

T – время инкубации.

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин (Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1998). В связи с широким диапазоном рН буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также рН-зависимостью биолюминесценции ферментативной системы (Строев В.А., 1986), калибровочные графики строились для каждого рН буфера. На рис. 1. представлен пример подобной зависимости.

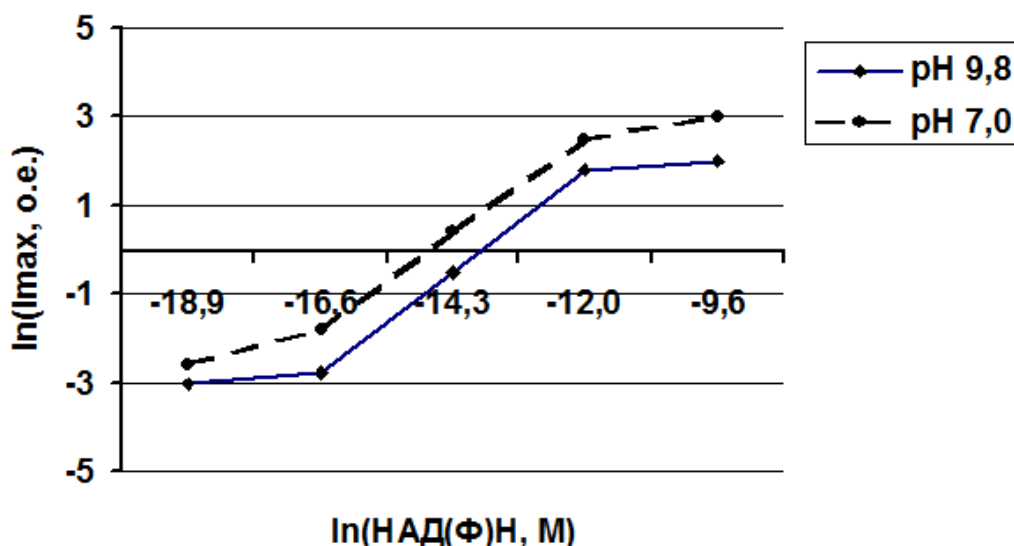


Рисунок 1 – Интенсивность билюминесценции НАД(Φ)Н:ФМНоксидоредуктазы-люциферазы в зависимости от концентрации НАД(Φ)Н и pH буфера

2.5 Статистические методы исследования

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($C_{25} - C_{75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязи показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирману.

3 Результаты исследований и их обсуждение

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

Список сокращений

- АФК – активные формы кислорода
- ГЗФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (НАД-зависимая)
- Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ГР – глутатионредуктаза
- ИА – Индекс активации
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- КТ – компьютерная томография
- МДГ – малатдегидрогеназа
- НАД⁺ – никотинамиддинуклеотид окисленный
- НАДГДГ – НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа
- НАДИЦДГ – НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа
- НАДН – никотинамиддинуклеотид восстановленный
- НАДН-ГДГ – НАДН-зависимая реакция глутаматдегидрогеназы
- НАДН-ЛДГ – НАДН-зависимая реакция ЛДГ (анаэробная)
- НАДН-МДГ – НАДН-зависимая реакция МДГ
- НАДФ⁺ – никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- НАДФГДГ – НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа
- НАДФИЦДГ – НАДФ-зависимая
- НАДФМДГ – НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа
- НГ – нейтрофильные гранулоциты
- РГП – распространенный гнойный перитонит
- СР – свободный радикал
- ССС – сердечно-сосудистая система
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ХЛ – хемилюминесценция

Список используемой литературы

1. Сараев, А.Р. Современные аспекты диагностики и лечения перитонита / А.Р. Сараев, К.М. Курбонов, Ф.И. Махмадов // Известия академии наук республики таджикистан отделение биологических и медицинских наук. – 2010. – №2 – С. 83-84.
2. Томнюк, Н.Д. Перитонит, как одна из основных причин летального исхода / Н.Д. Томнюк, Е.П. Данилина, А.Н. Черных, А.А. Парно, К.С. Шурко // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10 – С. 81-84
3. Савченко, А.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных с распространенным гнойным перитонитом / А.А. Савченко, Д.Э. Здзитовецкий, А.Г. Борисов, Н.А. Лузан // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – №3 – С. 159-162.
4. Иммунный статус при перитоните и пути его патогенетической коррекции: руководство для врачей / Ю.М. Гаин [и др.]. – Минск: ООО «Юнипресс», 2001. – 256с.
5. Госпитальная хирургия: руководство для врачей-интернов / Л.Н. Бисенкова [и др.]. – Санкт-Петербург: Издательство «Лань», 2005. – 896с.
6. Распространенный гнойный перитонит: монография / В.В. Бойко, И.А. Криворучко, С.Н. Тесленко, А.В. Сивожелезов. – Харьков: Прапор, 2008. – 280с.
7. Хирургические болезни: Учебник/ М. И. Кузин [и др.]; Под ред. М. И. Кузина. — 3-е изд., перераб. и доп. - Москва: Медицина, 2002. - 784 с.
8. Ярилин , А.А. Иммунология : учебник / А. А. Ярилин. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
9. Механизмы генерализации инфекционного воспаления / Э.А. Кашуба, Н.А. Курлович, Г.И. Козинец, Т.Х. Тимохина, Т.Г. Дроздова // Известия челябинского научного центра. – 2004. – Спец. выпуск 25 – С. 78-82.

10. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов, В. Н. Крутько, Б. М. Мрикаев, С. В. Уханов // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19 – С. 50-69.
11. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.] - Москва: Фирма «Слово», 2006. - 556 с.
12. Латышева, А.Н. Бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких: особенности системы оксидант-антиоксидант / А.Н. Латышева, С.В. Смирнова, А.Ф. Колпакова. – Красноярск: Издательство КраГМУ, 2011. – 110 с.
13. Савченко, А.А. Основы клинической иммунометаболомики / А.А. Савченко, А.Г. Борисов. – Новосибирск: Наука, 2012. – 263 с.
14. Косинец, В.А. Изменения в системе иммунитета при распространенном гнойном перитоните и возможности его коррекции / В.А. Косинец // Новости хирургии. – 2012. – Т. 20, № 3. – С. 36–42.
15. Матусевич, Е.А. Метаболическая коррекция Т-клеточного иммунитета и эндогенной интоксикации при распространенном гнойном перитоните / Е.А. Матусевич // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23, № 1. – С. 77–84.
16. Березов, Т.Т. Биологическая химия: Учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин – 3-е изд., стереотипное – М.: ОАО «Издательство Медицина», 2007. – 704 с.
17. Нестерова, И.В. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Е.И. Клещенко, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, Т.В. Смерчинская, О.И. Сапун, С.В. Сторожук // Иммунология. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 61–65.
18. Балачевский, Б.В. Доларгин-индуцированная модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных

- гранулоцитов / Б.В. Балачевский, А.Н. Курзанов, А.А. Славинский // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 5. – С. 75–77.
19. Сарап, П.В. Активность дегидрогеназ лимфоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от тяжести заболевания по шкале Мангеймского индекса / П.В. Сарап // Сибирский медицинский журнал. – 2003. – Т. 41, № 6. – С. 25 – 28.
20. Щербинина, А.С. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови больных раком желудка в зависимости от гистологического типа опухоли / А.С. Щербинина, М.В. Яцинов, Н.Н. Казакова // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № S2. – С. 131 – 132.
21. Авагимов, А.Г. Функциональная активность нейтрофильных лейкоцитов при воспалительных заболеваниях пародонта / А.Г. Авагимов, М.А. Бондаренко, И.А. Славинский // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. – № 3–4. – С. 8 – 10.
22. Балашова, С.Н. Взаимосвязь функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов периферической крови у жителей Арктики / С.Н. Балашова, В.П. Патракеева // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 2. – С. 114 – 115.
23. Нестерова, И.В. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евглевский // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 4. – С. 257 – 265.
24. Михеева, Э.Р. Цитохимический анализ нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками / Э.Р. Михеева, С.Н. Плескова, Е.Н. Горшкова, Е.Е. Пудовкина // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2010. – № 10. – С. 61.
25. Перитонит: практическое руководство / С. Ф. Багненко [и др.]; отв. ред. В.С. Савельев. – М.: Литтерра, 2006. – 208 с.

- 26.Чепурная, И.М. Этиология интраабдоминальных инфекций (обзор) / И.М. Чепурная, Е.В. Русанова, И.А. Шагинян, Ю.В. Захаров // Альманах клинической медицины. – 2012. – № 26. – С. 83 – 85.
- 27.Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 528 с.
- 28.Афанасьев, Ю.И. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Ю.И. Афанасьев [и др.] – Изд. 6-е, перераб. и доп. –М.: Медицина, 2012. – 800 с.
- 29.Van Till J.W., van Veen S.Q., van Ruler O. et al. The innate immune response to secondary peritonitis // Shock. – 2007. –Vol. 28, N 5. –P. 504–517.
- 30.Phillipson M., Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation // Nat. Med. – 2011. – Vol.17, №11. – P. 1381-1390.
- 31.Seth R., Ribeiro M., Romaschin A. et al. Occupational endotoxin exposure and a novelluminol-enhanced chemiluminescence assay of nasal lavage neutrophil activation // J. Allergy Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 127, №1. – P. 272-275.
- 32.Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease // Trends Immunol.–2010.– Vol. 31, N 8.–P. 318–324.
- 33.Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C., Edwards S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases // Rheumatology (Oxford). – 2010. – Vol. 49, N 9. – P. 1618–1631
- 34.Martin K.R., Kantari-Mimoun C., Yin M., et al. Proteinase 3 is a phosphatidylserine binding protein which affects the production and function of microvesicles // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291, N 20. – P. 10476 – 10489.
- 35.Alexopoulou A., Vasilieva L., Agiasotelli D., Siranidi K., Pouriki S., Tsiriga A., Toutouza M., Dourakis S. Extensively drug-resistant bacteria are an independent predictive factor of mortality in 130 patients with spontaneous

- bacterial peritonitis or spontaneous bacteremia // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22, N 15. – P. 4049-4056.
36. Bonacorsi C., Raddi M., Marcos da Fonseca L., Sannomiya M. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst // *Molecular Sciences.* – 2012. – P. 133 – 141.
37. Vaitkus M., Lavinskiene S., Barkauskiene D., Bieksiene K., Jeroch J., Sakalauskas R. Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood and Sputum Neutrophils During Bacterial and Nonbacterial Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Inflammation.* – 2013. – Vol. 36, № 6. – P. 1485 – 1494.
38. McMillan S., Sharma R., Richards H., Hegde V., Crocker P. Siglec-E promotes β 2-integrin-dependent NADPH oxidase activation to suppress neutrophil recruitment to the lung // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 29. – P. 20370 – 20376.
39. Marrali G., Salamone P., Casale F., Fuda G., Cugnasco P., Caorsi C., Amoroso, A., Calvo A., Lopiano L., Cocito D., Chio A. NADPH oxidase 2 (NOX2) enzyme activation in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy // *Neurology.* – 2016. – Vol. 23, N 5. – P. 958 – 963.
40. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G. et al. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils // *Vet. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 36, N 1. – P. 29–33.