

Жаворонок Татьяна Васильевна

**РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЙ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛОВ
ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,
профессор

доктор медицинских наук,
профессор

**Рязанцева Наталья
Владимировна
Степовая Елена Алексеевна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, профессор
кафедры морфологии и общей патологии ГБОУ
ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Хлусов Игорь Альбертович

доктор медицинских наук, профессор, член-
корреспондент РАМН, заведующий лабораторией
физиологии, молекулярной и клинической
фармакологии, заместитель директора по научной и
лечебной работе ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН

Удуд Владимир Васильевич

доктор медицинских наук, профессор, заведующий
лабораторией медицинской биотехнологии,
заместитель директора по научной работе ФГБУ
НИИ биохимии СО РАМН

Поляков Лев Михайлович

Ведущая организация: ФГБУ НИИ медицинских проблем Севера Сибирского
отделения РАМН (г. Красноярск)

Защита состоится «25» мая 2012 г. в 14 часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО «Сибирский
государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России
(634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан « » 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одним из наиболее актуальных вопросов медицины остается проблема идентификации молекулярных и клеточных механизмов воспаления, лежащего в основе большинства заболеваний. Течение и исходы острого воспаления (ОВ) во многом зависят от функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Маянский А.Н., 2007; Rutkowski R. et al., 2007].

Нейтрофил является ключевой клеткой в развитии ОВ. С одной стороны, он относится к клеткам-эффе́кторам очага воспаления, где запускает целый каскад молекулярных механизмов, от которых зависит, перейдет ли процесс в хроническую фазу или наступит разрешение воспаления. С другой стороны, нейтрофил выступает продуцентом веществ, принимающих участие в развитии и поддержании воспаления, к числу которых относятся: активные формы кислорода (АФК), ферменты азурофильных и специфических гранул, провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли α (TNF α), интерферон γ , интерлейкины (IL) -1, -8 и др.), лейкотриены, простагландины, факторы сосудистой проницаемости и иные биологически активные вещества [Yamamoto K., et al., 2003; Коваленко Е.И. и соавт., 2007; Grimstad O. et al., 2011].

При остром воспалении гиперпродукция АФК нейтрофилами носит адаптивный характер, но она же предполагает возможность нарушения редокс-зависимых путей регуляции клетки [Маянский Н.А., 2004; Луцак В.И., 2007; Rutkowski R. et al., 2007; Зенков Н.К. и соавт., 2009]. Накопление АФК в нейтрофильных гранулоцитах может приводить к окислительной модификации макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот), нарушению функций и повреждению клеток, активации запрограммированной гибели вследствие развития окислительного стресса (ОС) [Владимиров Ю.А., 2000; Peake J., Suzuki K., 2004; Nathan C., 2006; Бурлакова Е.Б., 2006; Дубинина Е.Е., 2006; Чеснокова Н.П., 2007; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2008; Català A., 2009].

Ведущую роль в защите от повреждающего действия АФК и поддержании редокс-статуса нейтрофилов, от которого зависит эффективность их функционирования, играет тиолдисульфидная система (ТДС) [Stadtman E.R., Levine R.L., 2000; Chapple I.L., 2002; Калинина Е.В. и соавт., 2008]. Эффекты этой системы основаны на восстановительном потенциале глутатиона (GSH) [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2009]. GSH выступает акцептором АФК, кофактором ряда ферментов антиоксидантной и детоксикационной систем [Zhu Y et al., 2007; Калинина Е.В. и соавт., 2008], участвует в экспрессии редокс-чувствительных генов, регуляции внутриклеточной сигнализации [Pietarinen-Runtti P., et al., 2000; Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2009]. Глутатион и сопряженные с ним ферментативные редокс-белки ТДС (перокси-, глута-, тиоредоксины и др.) обеспечивают процесс S-тиоляции/

детоляции активных центров протеинов, защищая их от необратимой окислительной модификации и инактивации [Дас Д.К., Молик Н., 2004; Nakamura H., 2004; Trudel S. et al., 2009; Liu G. et al., 2010], что способствует поддержанию функциональной активности клеток. Изучение механизмов оптимизации редокс-состояния ТДС в нейтрофилах актуально в плане поиска путей возрастания эффективности функционирования этих клеток при ОВ.

Механизмом контроля гомеостаза в организме является апоптоз [Керр J.F.R., 1972; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Активация запрограммированной гибели клетки напрямую связана с развитием ОС. АФК участвуют в реализации танатогенной программы посредством изменения редокс-регуляции клетки, экспрессии генов [Белушкина Н.Н. с соавт., 1998; Дубинина Е.Е., 2006], открытия пор в мембране митохондрий с высвобождением Ca^{2+} и проапоптотических белков (AIF, Smac, прокаспаза 9, цитохром *c*) [Yi J. et al., 2002; Лушак В.И., 2007]. Несмотря на очевидность взаимных связей между ОС и апоптозом, роль АФК в ограничении срока жизнедеятельности нейтрофилов посредством реализации запрограммированной гибели не вполне ясна. Среди АФК уникальной химической природой и множеством внутриклеточных мишеней обладает NO, что обеспечивает ему как проапоптотические [Hortelano S. et al., 1997; Bruene B., 1999; Лушак В.И., 2006; Кулинский В.И., 2007], так и антиапоптотические эффекты [De Nadai C. et al., 2000; Choi V.M. et al., 2002]. Остается открытой проблема выяснения молекулярных механизмов влияния молекул NO на запрограммированную гибель нейтрофилов в условиях окислительного стресса, развивающегося при ОВ.

Таким образом, идентификация редокс-зависимых механизмов нарушения функций нейтрофилов при ОВ и ОС в настоящее время лежит в плоскости понимания ряда молекулярных процессов: определения роли тиолдисульфидной системы в регуляции функционального статуса клетки, оценки выраженности окислительной модификации макромолекул регуляторных систем клетки, а также изучения молекулярных механизмов сопряжения ОС и апоптоза. Сосредоточение фундаментальных исследований на этом направлении необходимо для разработки технологических основ селективного управления острым воспалительным процессом.

Цель исследования: установить общие закономерности и особенности нарушений редокс-зависимых механизмов регуляции функциональных свойств нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе.

Задачи исследования:

1. Оценить функциональные свойства (активность миелопероксидазы, продукция активных форм кислорода и цитокинов – фактора некроза опухоли α и интерлейкина-8) и апоптоз нейтрофильных лейкоцитов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*.

2. Оценить состояние компонентов системы про- и антиоксидантов в мембране эритроцитов и плазме крови у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (внебольничная пневмония, острый аппендицит); выявить клинико-патогенетические закономерности в зависимости от особенностей клинического течения процесса воспаления.

3. Дать комплексную характеристику тиолдисульфидной системы нейтрофилов крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*, оценить ее функциональный резерв в условиях действия блокатора (N-этилмалеимид) или протектора (1,4-дителиоэритритол) SH-групп, ингибитора каталазы (3-амино-1,2,4-триазол) или синтеза глутатиона (бутионин-сульфоксимин).

4. Выявить общие закономерности и особенности влияния тиолдисульфидной системы на окислительную модификацию белков и функциональные свойства нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* в условиях действия блокатора или протектора SH-групп, ингибитора каталазы или синтеза глутатиона.

5. Установить роль оксида азота в механизмах дизрегуляции апоптоза нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* в условиях индукции (L-аргинин) и ингибирования (N^G -нитро-L-аргинин метиловый эфир) NO-синтаз.

6. Идентифицировать молекулярные мишени влияния оксида азота на апоптоз нейтрофилов, оценив содержание белков-регуляторов с про- (Bax) и антиапоптотической (Bcl-2) активностью и концентрацию внутриклеточных сигнальных молекул (Ca^{2+} , цАМФ и цГМФ) при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* на фоне индукции и ингибирования NO-синтаз.

Научная новизна. Получены новые знания фундаментального характера о молекулярных механизмах изменения редокс-регуляции эффекторного потенциала и апоптоза нейтрофильных лейкоцитов крови при остром воспалении. Выявлено, что молекулярные механизмы изменений функциональных свойств нейтрофилов при остром воспалении и моделировании окислительного стресса с помощью 200 мкМ H_2O_2 являются однотипными и сопряжены с повышением карбонилирования и глутатионилирования белков в клетке.

Установлено, что дисбаланс редокс-статуса тиолдисульфидной системы, возникающий при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* вследствие блокады SH-групп 5 мМ N-этилмалеимидом (NEM), снижает функциональный статус нейтрофилов в отношении синтеза АФК и продукции провоспалительных цитокинов (IL-8 и TNF- α) и сопровождается сохранением уровня глутатионилирования белков. Показано, что при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* действие протектора SH-групп 5 мМ 1,4-дителиоэритритола (DTE) способствует снижению содержания карбонильных

производных белков нейтрофилов, а дефицит восстановленного глутатиона при ингибировании синтеза *de novo* 1 мМ бутионинсульфоксимином (BSO) приводит к накоплению карбонильных производных белков и перераспределению клеточного пула глутатиона с целью сохранения его белковосвязанной формы. Ингибирование синтеза глутатиона с помощью BSO снижает кислород-зависимые механизмы функциональной активности нейтрофилов (продукция $\cdot\text{OH}$ и активность миелопероксидазы), необходимые для обеспечения микробицидной функции, и не влияет на продукцию IL-8 и TNF- α . Ингибирование каталазы с помощью 2 мМ 3-амино-1,2,4-триазола (AT) при остром воспалении компенсируется участием тиолдисульфидной системы в поддержании редокс-статуса и функциональной активности нейтрофилов, которые снижают только продукцию $\cdot\text{OH}$.

Показано, что при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*, моделируемом с помощью 5 мМ H_2O_2 , оксид азота ограничивает реализацию запрограммированной гибели нейтрофилов в условиях индукции синтеза NO 500 мкМ L-аргинином. Продемонстрировано, что молекулярные механизмы антиапоптотического влияния NO на запрограммированную гибель нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* не связаны с изменением баланса про- (Bax) и антиапоптотических (Bcl-2) белков, а опосредованы участием цГМФ, цАМФ и ионов кальция.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в результате проведенного исследования фактические данные расширяют существующие фундаментальные представления о процессах дизрегуляции редокс-статуса и функциональной активности нейтрофилов крови при остром воспалении. Выявлен редокс-зависимый характер нарушений функций нейтрофильных гранулоцитов, сопряженный с состоянием тиолдисульфидной системы, и определена роль восстановленного и белковосвязанного глутатиона в регуляции процессов окислительной модификации белков и поддержании функционального статуса нейтрофилов у пациентов с острым воспалением и при моделировании окислительного стресса *in vitro*. Данные о роли глутатиона в поддержании функциональной активности нейтрофилов и регуляции процессов окислительной модификации белков позволяют разработать подходы для эффективного патогенетически обоснованного использования антиоксидантов в комплексной терапии острых воспалительных заболеваний.

Идентифицированы молекулярные мишени оксида азота, опосредующие механизмы его влияния на индукцию апоптоза нейтрофилов при остром воспалении и моделировании окислительного стресса. Основные положения исследования могут служить базой для идентификации молекулярных мишеней, подверженных воздействию активных форм кислорода при острых воспалительных заболеваниях. Установленные закономерности могут быть положены в основу разработки селективных молекулярных технологий

управления развитием процесса острого воспаления посредством влияния на функциональный статус и продолжительность жизни нейтрофилов.

Положения, выносимые на защиту:

1. При окислительном стрессе, индуцированном в условиях острого воспаления и *in vitro* с использованием 200 мкМ H₂O₂, имеют место однотипные редокс-зависимые механизмы изменений функциональных свойств нейтрофилов крови (увеличение активности миелопероксидазы, продукции радикала [•]ОН и провоспалительных цитокинов – интерлейкина-8 и фактора некроза опухоли α).

2. Нарушения состояния тиолдисульфидной системы нейтрофилов крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* (200 мкМ H₂O₂) характеризуются снижением содержания восстановленного глутатиона, SH-групп белков и активности глутатионпероксидазы при повышении концентрации окисленного и белковосвязанного глутатиона.

3. Механизмы нарушения функциональных свойств нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* (200 мкМ H₂O₂) обусловлены изменением процессов окислительной модификации белков (карбонилирования и глутатионилирования белковых молекул) и концентрации восстановленного глутатиона в клетке.

4. Молекулы оксида азота ограничивают реализацию апоптотической гибели нейтрофильных лейкоцитов при остром воспалении и экспериментальном окислительном стрессе, индуцированном 5 мМ H₂O₂, что сопряжено с изменением внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров (цГМФ, цАМФ и Ca²⁺) и не зависит от содержания про- (Bax) и антиапоптотических (Bcl-2) белков.

Апробация и внедрение результатов работы. Результаты исследований представлены и обсуждались на I и II съездах физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005; Кишинев, 2008), V и VI Сибирских физиологических съездах (Томск, 2005; Барнаул, 2008), региональной научной конференции «Механизмы индивидуальной адаптации» (Томск, 2006), научно-практической конференции «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований» (Ростов-на-Дону, 2006), XVI, XVII и XVIII Национальных конгрессах по болезням органов дыхания (С-Петербург, 2006; Казань, 2007; Екатеринбург, 2008), XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва, 2007), всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии» (Киров, 2007), всероссийской конференции «Национальные дни лабораторной медицины России» (Москва, 2007), III общероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития вузовской науки» (Дагомыс, Сочи, 2007), международном симпозиуме «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине» (Судак, 2007), 14 научно-практической конференции с международным

участием «Актуальные вопросы кардиологии» (Тюмень, 2007), II и III национальных конгрессах терапевтов (Москва, 2007 и 2008), XVI, XVII, XVIII и XIX конгрессах Европейского респираторного общества (Мюнхен, 2006; Стокгольм, 2007; Берлин, 2008; Вена, 2009), VIII международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010).

Исследования поддержаны Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (проект НШ-4153.2006.7), РФФИ (проекты № 07-04-12150 и № 09-04-99026); реализованы в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 гг.» (№ 02.442.11.7276 от 20.02.2006 и № 02.445.11.7419 от 09.06.2006) и ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 гг.» (№ 02.512.12.0013 от 01.08.2008 и № 02.512.11.2285 от 10.03.2009).

Основные результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии в разделах «Патофизиология воспаления» и «Патофизиология клетки», кафедры биохимии и молекулярной биологии в разделе «Патохимия клетки», кафедры пропедевтики внутренних болезней в разделе «Семиология воспалительных заболеваний системы органов дыхания и кровообращения» и в лечебно-диагностический процесс клиники пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России и отделения терапии МБЛПМУ «Городская больница скорой медицинской помощи» г. Томска.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 46 работ, из них 15 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 327 страницах и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования), выводов, списка литературы (544 источника: 168 отечественных и 376 иностранных). Работа иллюстрирована 29 таблицами и 15 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 125 человек: 90 пациентов (45 мужчин и 45 женщин, возраст от 18 до 50 л., в среднем 32 ± 3 л.) с острыми воспалительными заболеваниями (ОВЗ) (внебольничная пневмония (ВП) – 50 человек, острый аппендицит (ОА) – 40) и 35 здоровых доноров (18 мужчин и 17 женщин, возраст от 18 до 45 л., в среднем 29 ± 6 л.). Пациенты были обследованы в порядке скорой медицинской помощи при госпитализации в терапевтическое и хирургическое отделения МБЛПМУ Городская больница №1 г. Томска (главный врач – О.Н. Попадейкин), клиники ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (главный врач – засл. врач РФ, канд. мед. наук В.М. Шевелев). Диагноз устанавливали по данным анамнеза, физикального, клинико-лабораторных и инструментальных методов исследования. При ВП тип инфильтрата (интерстициальный у 20 и альвеолярный у 30 пациентов) и объем

его распространения (моносегментарный у 20 и полисегментарный у 30 человек) в паренхиме легких верифицировали с помощью компьютерной томографии с шагом 1,5 мм; при ОА выраженность воспаления (флегмонозное у 26 и гангренозное у 14 человек) определяли в ходе резекции аппендикса. Критериями исключения для больных ОВЗ и здоровых лиц являлись: возраст моложе 18 и старше 50 лет, наличие в анамнезе хронических инфекционных, вирусных, аутоиммунных заболеваний, сахарного диабета, злокачественных опухолей, психических расстройств, алкогольной и наркотической зависимости, отсутствие информированного согласия. Набор клинического материала проводили при участии Т.С. Агеевой – д-ра мед. наук, проф. кафедры пропедевтики внутренних болезней и Е.Г. Соколовича – д-ра мед. наук, проф. кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, а также А.В. Дубоделовой – канд. мед. наук, зав. отделением терапии и В.Я. Митасова – канд. мед. наук, зав. отделением хирургии МБЛМПУ Городская больница №1, за что автор выражает искреннюю благодарность.

Лабораторные исследования проводили на базе НОЦ молекулярной медицины (руководитель – канд. мед. наук О.Е. Савельева), межкафедральной лаборатории оптической спектроскопии (зав. лабораторией – Е.В. Шахристова) ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (ректор – академик РАМН В.В. Новицкий); лаборатории радионуклидных методов исследования (зав. лабораторией – доктор мед. наук Н.Г. Кривоногов) УРАМН НИИ кардиологии СО РАМН (директор – академик РАМН Р.С. Карпов) (г. Томск). Автор выражает благодарность В.В. Иванову – канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии и молекулярной биологии, О.Е. Савельевой – канд. мед. наук, руководителю НОЦ молекулярной медицины за интерес к работе, ценные теоретические и методические советы, помощь в организации исследований.

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая утром натощак с использованием вакуумных систем объемом 9,0 мл («Greiner-bio-one», Австрия) с гепарином лития. Из нее получали плазму, выделяли нейтрофилы путем центрифугирования на двойном градиенте плотности Ficoll-Raque ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) и Ficoll-урографин ($\rho=1,095 \text{ г/см}^3$) («GE Healthcare», Швеция), отмывали эритроциты изотоническим фосфатно-соляным буфером и далее получали мембраны эритроцитов с помощью гипоосмотического метода (Dodge J. et al., 1963) в модификации (Петрова М.П. и соавт., 1978).

В соответствии с целью и поставленными задачами был предложен дизайн исследования, предполагающий разделение работы на последовательные этапы: клинико-биохимический и экспериментальный. На первом этапе оценивали, с одной стороны, – развитие ОС при ОВЗ (ВП и ОА), для чего в плазме крови определяли показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), ОМБ и антиоксидантной системы, в мембране эритроцитов – показатели ПОЛ и активность Na^+/K^+ -АТФазы (табл. 1), с другой стороны, – состояние

нейтрофилов, включая оценку функционального статуса (продукция АФК, цитокинов, активность миелопероксидазы (МПО)), параметров ТДС, степени ОМБ и индукции апоптоза.

Таблица 1

Распределение здоровых доноров и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями в соответствии с задачей изучения процессов окислительной модификации белковых и липидных молекул плазмы крови и мембран эритроцитов, состояния компонентов антиоксидантной защиты в плазме крови

Группы обследованных лиц		Плазма крови					Мембраны эритроцитов			
		ТБК-реактивные продукты	Карбонильные производные белков	Битирозин	Окисленный триглицерин	Церулоплазмин	Каталаза	ТБК-реактивные продукты	Диеновые конъюгаты	Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза
Здоровые доноры		27	15	10	10	27	25	10	10	10
Пациенты с острым воспалением	Внебольничная пневмония	48	28	14	14	35	48	23	23	23
	Острый аппендицит	24	25	15	15	24	24	24	24	24

На втором этапе сначала проводили сравнительные исследования *in vitro* с целью оценки участия компонентов ТДС и ОМБ в поддержании функционального состояния нейтрофилов при ОС, для чего клетки, взятые у пациентов с ВП, культивировали с блокатором SH-групп N-этилмалеимидом в конечной концентрации 5мМ [Sahaf B. et al., 2003], протектором SH-групп 1,4-дитиоэритритолом в конечной концентрации 5мМ [Brumell J., 1995], ингибитором синтеза глутатиона бутионинсульфоксимином в конечной концентрации 1мМ [Laragione T. et al., 2003] или ингибитором каталазы 3-амино-1,2,4-триазолом в конечной концентрации 2мМ [Spolarics Z. et al., 1997] (все модуляторы «Sigma», США) в течение 18 ч в полной питательной среде при 37° С и 5 % CO₂; клетки, полученные у здоровых доноров, – в аналогичных условиях с добавлением 200 мкМ H₂O₂ (табл. 2).

Затем выявляли оптимальную концентрацию H₂O₂ (с использованием 1, 5, 10 и 50 мМ H₂O₂), способную вызывать на фоне развития ОС *in vitro* запуск апоптоза максимального числа нейтрофилов без индукции некроза, имитируя патологический процесс, формирующийся в отношении нейтрофилов при ОБЗ. Для проверки гипотезы об участии оксида азота в регуляции апоптоза нейтрофилов в условиях ОС и верификации молекулярных мишеней, ответственных за NO-зависимую модуляцию программированной гибели, клетки крови, полученные у пациентов с ОБЗ, инкубировали в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NAME («Fluka», США) в конечной концентрации 500

мкМ [Beltran B. et al., 2002] или субстрата NO-синтазной реакции L-аргинина («MP», США) в концентрации 500 мкМ [Niu X.-F. et al., 1996] в течение 18 ч в полной питательной среде при 37° С и 5 % CO₂, клетки здоровых доноров – в аналогичных условиях с добавлением 5 мМ H₂O₂ (табл. 3).

Таблица 2

Распределение здоровых доноров и пациентов с внебольничной пневмонией в соответствии с задачей изучения функциональной активности, состояния тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков нейтрофилов крови при окислительном стрессе in vitro и остром воспалении

Группы обследованных лиц		Интерлейкин-8	Фактор некроза опухоли α	Гидроксильный радикал	Миелопероксидаза	Глутатионпероксидаза	Тиоредоксинредуктаза	Восстановленный глутатион	Окисленный глутатион	SH-группы белков	Белковосвязанный глутатион	Карбонильные производные белков
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	8	8	22	22	18	18	12	12	12	12	14
	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂	8	8	13	13	13	13	10	10	10	10	12
	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и NEM	5	5	8	8	8	8	5	5	5	5	6
	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и DTE	5	5	8	8	8	8	5	5	5	5	6
	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и BSO	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
	Нейтрофилы, инкубированные с 200 мкМ H ₂ O ₂ и AT	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
Пациенты с внебольничной пневмонией	Интактные нейтрофилы	16	16	39	39	23	23	23	23	23	23	16
	Нейтрофилы, инкубированные с NEM	8	8	11	11	11	11	11	11	11	11	5
	Нейтрофилы, инкубированные с DTE	8	8	11	11	11	11	8	8	8	8	5
	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	5
	Нейтрофилы, инкубированные с AT	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	5

В супернатантах интактных, H₂O₂-стимулированных и инкубированных с модуляторами культур нейтрофилов определяли содержание цитокинов TNFα и IL-8, используя метод твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с протоколами производителя тест-систем («Вектор-бест», Россия) и метаболитов NO с помощью цветной реакции с реактивом Грисса [Green L.C. et al., 1982]. Число аннексин-положительных клеток в культуре и содержание АФК и Ca²⁺ в нейтрофилах определяли методом проточной

лазерной цитометрии, используя цитометр Epics XL («Beckman Coulter», Франция): концентрацию АФК в клетках – с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией дихлорфлуоресцеина диацетата («Sigma», США) [Bass D.A. et al., 1983], содержание Ca^{2+} в цитоплазме – оценивая интенсивность флуоресценции липофильного зонда Fluo 3 AM («MP Biomedicals», США), связывающего Ca^{2+} [Merritt J.E. et al., 1990]; реализацию апоптоза – с помощью набора «ANNEXIN V FITC» («Beckman Coulter», Франция), содержащего обладающий сродством к фосфатидилсерину мембран аннексин V, меченый флуоресцеин изотиоцианатом [Van Engeland M. et al., 1998]. Концентрацию белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и Вах в нейтрофилах оценивали методом вестерн-блоттинга, для чего получали клеточные экстракты путем лизиса клеток и, разделив белки по молекулярной массе под действием электрического поля (напряжение 120 В, 60 мин), переносили их на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) электрофоретически (сила тока 60 мА, 90 мин), блоты инкубировали с первичными антителами к белкам-регуляторам («Biosource», США), в качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу («Chemicon», США).

Таблица 3

Распределение здоровых доноров и пациентов с острыми воспалительными заболеваниями в соответствии с задачей исследования влияния NO на реализацию программированной гибели и системы внутриклеточной регуляции апоптоза нейтрофилов при окислительном стрессе и остром воспалении

Группы обследованных лиц		Метаболиты NO	Активные формы кислорода	Апоптогические клетки	цАМФ	цГМФ	Ионы кальция	Белок Вах	Белок Bcl-2
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	22	32	32	7	7	22	3	3
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H ₂ O ₂	22	32	32	7	7	22	3	3
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H ₂ O ₂ и L-аргинином	22	22	22	6	8	22	3	3
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H ₂ O ₂ и L-NAME	22	22	22	7	9	22	3	3
Пациенты с острым воспалением	Интактные нейтрофилы	54	54	54	14	14	54	3	3
	Нейтрофилы, инкубированные с L-аргинином	54	54	54	15	16	54	3	3
	Нейтрофилы, инкубированные с L-NAME	54	54	54	17	14	54	3	3

В нейтрофилах определяли: продукцию $\cdot\text{OH}$, учитывая его способность разрушать модельный субстрат 2-дезоксид-рибозу [Thom S.R., Elbuken M.E., 1991]; активность ферментов: МПО – методом, основанным на реакции окисления о-фенилендиамина пероксидом водорода [Арутюнян А.В. и соавт., 2000], глутатионпероксидазы (ГПО) – методом, основанным на реакции взаимодействия GSH с гидроперекисью т-бутила [Карпищенко А.И., 1999], тиоредоксинредуктазы – методом, основанным на НАДФН-зависимом восстановлении 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислоты [Tamura T., Stadtman E.R., 1996]; а также содержание компонентов ТДС: GSH и окисленного глутатиона (GSSG) – кинетическим методом, предложенным М.Е. Anderson (1985) в модификации [S. Kojima et al., 2004], тиоловых групп белков (Б-SH) и белковосвязанного глутатиона (Б-SSG) – методом, основанным на способности тиолов реагировать с 5,5'-дитио-бис(2)-нитробензойной кислотой с образованием окрашенного соединения и участии боргидрата в высвобождении из связи с белками глутатиона, концентрацию которого измеряли спектрофотометрически [Burchill B.R. et al., 1978]; карбонильных производных белков (КПБ) – методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора «Protein Carbonyl ELISA Kit» («Alexis Corporation», Швейцария); общего белка – методом М.М. Bradford (1976); циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) – методом радиоиммунного анализа, используя наборы «RIA AMPc/cAMP» и «RIA cGMP» («Immunotech», Франция).

В плазме крови оценивали содержание продуктов окислительной модификации макромолекул: КПБ – методом, основанным на взаимодействии окисленных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенилгидразином [Арутюнян А.В. и соавт., 2000], битирозина и окисленного триптофана – флюориметрическим методом К.Д. Davies (1987) в модификации [Бекман Э.М. и соавт., 2006], продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) – по их способности к образованию окрашенного триметинового комплекса [Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972]; кроме того, оценивали компоненты антиоксидантной системы: активность каталазы – методом, основанным на способности пероксида водорода к образованию окрашенного комплекса с солями молибдата аммония [Королюк М.А. и соавт., 1988], содержание церулоплазмينا – методом, учитывающим его способность окислять диамины с последующей реакцией с п-фенилендиамином [Камышников В.С., 2000].

В мембране эритроцитов (модель клеточной мембраны) определяли концентрацию ТБК-РП [Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972], диеновых конъюгатов гидроперекисей липидов, основываясь на их способности поглощать свет при длине волны 233 нм [Косухин А.Б., Ахметова Б.С., 1987], и активность Na^+/K^+ -АТФазы методом А.М. Казеннова и соавт. (1984) в модификации [Мацкевич Ю.А. и соавт., 1994], оценивая нарастание уровня неорганического фосфора при гидролизе АТФ («MP Biomedicals», США).

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Лакин Г.Ф., 1980; Гланц С., 1999]. Для каждой выборки вычисляли медиану, первый и третий квартили. Проверку нормальности распределения показателей проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, различия между зависимыми выборками оценивали непараметрическим критерием Вилкоксона, между независимыми выборками – ранговым критерием Манна-Уитни. Наличие связи между изученными показателями определяли с помощью корреляционного анализа Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Особенности реализации окислительного стресса при острых воспалительных заболеваниях

Современные представления о развитии и исходах острого воспаления основываются на признании значимой роли функционального состояния активированных нейтрофилов в инициации ОС [Маянский Д.Н., 1997; Болдырев А.А., 1998; Rahman I., 2005; Кленова Н.А., 2006; Кулинский В.И., 2007]. Гиперпродукция АФК необходима нейтрофилам для обеспечения микробицидных эффектов, но она же индуцирует процессы окислительной модификации макромолекул в клетках очага воспаления, самих нейтрофильных гранулоцитах и может быть причиной индукции апоптоза. Постоянный контакт с АФК потенцирует дисбаланс редокс-состояния нейтрофилов, приводя к угнетению их функций, дезадаптации и быстрой элиминации, что негативно сказывается на разрешении процесса ОВ. В такой ситуации необходимо создание селективных технологий управления воспалительным процессом на основе комплексного подхода к изучению компонентов антиоксидантной системы, определяющих молекулярные механизмы поддержания редокс-статуса и функциональной активности нейтрофилов, а также к пониманию редокс-зависимых механизмов регуляции продолжительности жизни этих клеток.

Наше исследование было нацелено на оценку редокс-состояния и функциональных свойств нейтрофилов, механизмов участия ТДС в поддержании эффективности жизнедеятельности данных клеток и роли NO (как одной из ведущих форм АФК) в реализации апоптоза нейтрофилов при окислительном дисбалансе, формирующемся на фоне ОВЗ. Для решения этой проблемы были проведены клиничко-лабораторные исследования (изучение нейтрофилов, полученных у пациентов с ОВЗ) и выполнен экспериментальный блок (проведение ингибиторного анализа в условиях сравнительного изучения клеток, полученных у пациентов с ОВЗ, и нейтрофилов, взятых у здоровых доноров и оцениваемых на фоне ОС *in vitro*). Продукцию АФК, состояние процессов ПОЛ, ОМБ и антиоксидантной системы при ОВ в клинике внутренних болезней мы оценивали, главным образом, на примере ВП,

поскольку окислительные процессы в легких не лимитированы содержанием кислорода, а также при воспалительном процессе, формирующемся на фоне ОА.

В первую очередь, была проведена оценка функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов как эффекторных клеток ОВ. У больных ВП и ОА, выявлено увеличение уровня АФК в нейтрофилах – в 2,7 и 2,8 раза, соответственно, по сравнению с таковым в контроле [0,240 (0,214–0,259) усл.ед., $p < 0,05$], а также содержания метоболитов NO в среде инкубации нейтрофилов – в 1,5 и 1,4 раза относительно такового у здоровых доноров [0,108(0,106–0,110) мкМ] ($p < 0,05$). Кроме того, при ВП с преимущественно интерстициальным и альвеолярным типами инфильтрации ткани легких у пациентов были увеличены уровень продукции $\text{O}_2\text{H}^\bullet$ в нейтрофилах (2,0 и 1,8 раза, соответственно) и активность МПО, образующей бактерицидные гипогалоиды (в обоих случаях в 1,2 раза) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Помимо включения кислород-зависимых механизмов защиты, нейтрофилы регулируют течение ОВ посредством синтеза и секреции цитокинов [Маянский А.Н., 1989; Симбирцев А.С., 2004; Нестерова И.В. и соавт., 2006]. При ВП содержание провоспалительных цитокинов IL-8 и TNF- α в среде инкубации нейтрофилов возрастало в случае альвеолярной инфильтрации легочной паренхимы в 1,2 и 1,4 раза, соответственно, в случае интерстициальной – в 1,2 и 1,3 раза, соответственно, по сравнению со значениями аналогичных показателей в контроле ($p < 0,05$). Достоверных различий в значениях показателей, характеризующих функциональный статус нейтрофилов крови, выявлено не было как между подгруппами больных ВП ($p > 0,05$), так и пациентами групп ВП и ОА ($p > 0,05$).

Активация нейтрофилов при ОВ становится потенцирующим моментом в развитии ОС, который всегда сопровождается выраженными изменениями в системе про-/антиоксиданты крови и повреждением клеточных мембран. Оценка содержания ТБК-РП, характеризующих интенсивность ПОЛ, в плазме крови и мембране эритроцитов у лиц с ОВЗ показала повышение обеих величин этого параметра относительно таковых у здоровых доноров [0,21 (0,18-0,26) мкмоль/л и 4,47 (2,75-5,67) нмоль/мг, соответственно] ($p < 0,05$). Активация процессов ПОЛ снижает устойчивость мембран к прооксидантным влияниям и способствует нарушению функций мембран и клетки в целом. В частности, в мембране эритроцитов во всех подгруппах пациентов с ОВЗ нами выявлено угнетение активности Na^+/K^+ -АТФазы в 4,1–5,5 раза по сравнению со значениями показателя у здоровых лиц [0,077(0,061-0,108) мкМ/(ч·мг)] ($p < 0,05$).

Избыток АФК в нейтрофильных лейкоцитах вместе с ростом концентрации продуктов ПОЛ в крови у пациентов с ВП способствовал индукции процессов окислительной модификации белков и накоплению в плазме крови продуктов ОМБ – окисленного триптофана, битирозиновых сшивок и КПБ (рис. 1). Прирост значений концентрации КПБ в плазме крови у пациентов с ВП относительно таковой у здоровых лиц в контроле ($p < 0,05$) был отмечен при

спонтанном и металл-катализируемом окислении, что свидетельствует о выраженной деструкции и высокой окисляемости белков плазмы (рис. 1). Металл-катализируемое окисление провоцировали компоненты системы Фентона, что связано, главным образом, с генерацией $\cdot\text{OH}$, а также некоторого количества феррил- и перферрил-ионов (FeO^{2+} и FeOH^{3+}). При ВП нами отмечена тесная взаимосвязь между уровнем генерации $\cdot\text{OH}$ нейтрофилами и концентрацией продуктов металл-катализируемого окисления в плазме крови ($r=0,90$, $p<0,05$ – при $\lambda=274$ нм; $r=0,82$, $p<0,05$ – при $\lambda=373$ нм). Повышение карбонилирования белков выявлено не только в плазме крови, но и в самих нейтрофилах (рис. 1 и 2), причем, при ВП показана высокая степень корреляции уровня КПБ в клетках и в плазме крови ($r=0,83$, $p<0,05$ – спонтанное окисление, $\lambda=274$ нм; $r=0,86$, $p<0,05$ – металл-катализируемое окисление, $\lambda=363$ нм).



Рис. 1. Особенности окислительной модификации белков плазмы крови у пациентов с внебольничной пневмонией

Примечание: 1 – карбонильные производные белков (КПБ), спонтанное окисление ($\lambda=274$ нм), 2 – КПБ, спонтанное окисление ($\lambda=363$ нм), 3 – КПБ, металл-катализируемое окисление ($\lambda=274$ нм), 4 – КПБ, металл-катализируемое окисление ($\lambda=363$ нм), 5 – битирозин, 6 – окисленный триптофан

Вывод о значительной степени повреждения белков при ВП подтверждает зарегистрированный нами в плазме крови высокий уровень стабильных нерепарируемых модификаций триптофана и тирозина (рис. 1). Образование битирозиновых сшивок считается, в первую очередь, следствием действия синтазы оксида азота и МПО [Рябов Г.А., Азизов Ю.М., 2002], активность которых в нейтрофилах при ВП была увеличена ($r=0,82$, $p<0,05$, – корреляция между активностью МПО и содержанием битирозина в плазме крови), а окисление триптофана зависит от действия $\cdot\text{OH}$ [Aquilina J.A. et al., 2000; Дубинина Е.Е., 2006] ($r=0,94$, $p<0,05$, – корреляция между продукцией $\cdot\text{OH}$ нейтрофилами и уровнем окисленного триптофана в плазме крови).

Значимых различий по изученным показателям ПОЛ и ОМБ между подгруппами пациентов с ВП обнаружено не было ($p > 0,05$). Вместе с повышением содержания продуктов ПОЛ и ОМБ в плазме крови у пациентов с ВП и ОА отмечалось снижение антиоксидантной активности каталазы по сравнению с таковой в контроле [26,17 (24,54-27,78) мкат/л] ($p < 0,05$), что может быть связано с повреждением фермента продуктами ПОЛ и АФК и провоцирует их дополнительный прирост. Угнетение активности каталазы у всех пациентов с ВП могло быть частично компенсировано одинаково выраженным ростом концентрации белка-антиоксиданта острой фазы церулоплазмينا относительно контроля [62,30 (54,41-69,11) мг/л] ($p < 0,05$).

Следовательно, полученные нами данные свидетельствуют о развитии в острый период ОВЗ состояния ОС, который затрагивает весь организм в целом. При этом окислительный статус самих нейтрофильных лейкоцитов в значительной мере зависит от продукции АФК, избыток которых инициирует окислительное повреждение макромолекул и нарушает функциональную активность клеток. Гиперпродукция АФК используется для защиты от флогогенов, но она же выступает функциональной особенностью нейтрофилов, направленной на удаление этих потенциально опасных клеток, ставших неполноценными. При ВП и ОА нами показано равнозначное ($p > 0,05$) увеличение количества аннексин-положительных нейтрофилов относительно значений показателя у здоровых лиц [49,25 (45,03–58,13) %] ($p < 0,05$), что сопровождалось одинаковым в обоих случаях ($p > 0,05$) ростом содержания проапоптотического белка Вах в клетках по сравнению с таковым в контроле ($p < 0,05$).

Необходимо еще раз подчеркнуть четко прослеживаемую, согласно нашим данным, закономерность: отсутствие значимых различий между пациентами с ОВ средней степени тяжести разной локализации (ВП и ОА), как и между подгруппами пациентов с ВП, по всем изученным показателям в нейтрофилах (внутриклеточный уровень АФК, активность МПО, продукция цитокинов и инициация апоптоза) и выраженности проявлений ОС в организме, регистрируемого по параметрам ПОЛ и антиоксидантной защиты. Это позволило нам в ходе дальнейших исследований объединить всех больных ВП и ОА в одну клиническую группу и оценивать изменения при ОВЗ как проявления типового патологического процесса – ОВ.

В целом, от адекватности продукции АФК в острую фазу воспаления и состояния антиоксидантной защиты клетки зависит не только эффективность и продолжительность функционирования, но и сама жизнь нейтрофилов. В этом плане остаются недостаточно изученными, с одной стороны, механизмы поддержания антиоксидантных свойств тиолдисульфидной системы, обеспечивающей результативность функционирования нейтрофилов при ОВ, с другой, – механизмы участия отдельных АФК в процессах элиминации данных клеток, что необходимо для успешного разрешения воспалительного процесса.

2. Сравнительная оценка функциональных свойств, редокс-состояния тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*

На следующем этапе работы необходимо было соотнести функциональный статус нейтрофилов при ОВ с таковым в условиях моделирования ОС *in vitro* и, одновременно, оценить зависимость функциональной активности клеток от редокс-состояния ТДС и окислительной модификации белков. Для моделирования ОС *in vitro* в культурах нейтрофилов, полученных у здоровых доноров, был выбран электростатически нейтральный пероксид водорода, способный быстро диффундировать через мембраны клеток [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Оптимальными для моделирования ОС считаются концентрации H_2O_2 от 100 до 500 мкМ [Pietarinen-Runtti P. et al., 2000; Коваленко Е.И. и соавт., 2007], а более высокие (1 мМ и выше – в зависимости от типа клетки) могут активировать запуск апоптоза [Cumming R.C. et al., 2004]. Поэтому для индукции ОС *in vitro* при изучении влияния редокс-состояния ТДС на функции нейтрофилов мы использовали концентрацию H_2O_2 200 мкМ, которая активирует ОМБ, но не апоптоз [Grune T. et al., 1995].

Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов при ВП и моделировании ОС *in vitro* показал равнозначное в обоих случаях ($p > 0,05$) повышение активности МПО, продукции клетками $\cdot OH$ и цитокинов (рис. 2). Скорее всего, при ОС *in vitro*, индуцированном 200 мкМ H_2O_2 , и в условиях ОВ имеют место однотипные редокс-зависимые механизмы изменений функциональных свойств нейтрофилов. В частности, регуляцию синтеза провоспалительных цитокинов опосредуют факторы транскрипции семейства NF- κB , которые подвержены влиянию АФК и зависят от редокс-состояния клетки [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Способность факторов транскрипции связываться с ДНК могут регулировать оксиданты, модулируя редокс-статус их цистеиновых остатков [Pool L.V. et al., 2004].

Ведущую роль в поддержании редокс-статуса нейтрофилов, который определяет эффективность их функционирования и лежит в основе защиты от повреждающего действия АФК, играет тиолдисульфидная система [Stadtman E.R., Levine R.L., 2000; Калинина Е.В. и соавт., 2008]. Наши данные показывают, что ключевым фактором, определяющим нарушения редокс-состояния ТДС нейтрофилов крови при ОВ и ОС *in vitro* (200 мкМ H_2O_2), является снижение концентрации GSH, сопряженное с уменьшением свободных SH-групп белков и активности ГПО при повышении содержания GSSG и Б-SSG. GSH ингибирует АФК, обеспечивает восстановление гидроперекисей фосфолипидов мембран глутатион-S-трансферазами и ГПО [Hayes J.D. et al., 2005; Зенков Н.К. и соавт., 2009; Liu G. et al., 2010]. Концентрация GSH в клетках при моделировании ОС была в 2,7 раза, при ВП – в 3,0 раза ниже контроля ($p < 0,05$), а содержание GSSG выше такового в контроле в 2,0 и 1,7 раза, соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2).

Редокс-состояние ТДС и клетки в целом обусловлено соотношением GSH/GSSG – одним из общепризнанных критериев оценки выраженности ОС [Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Reed M.C. et al., 2008]. Расчет величины соотношения GSH/GSSG в нейтрофилах показал ее снижение при ОС *in vitro* в 6,2 раза, при ВП – в 6,5 раза по сравнению с таковым в контроле ($p < 0,05$).

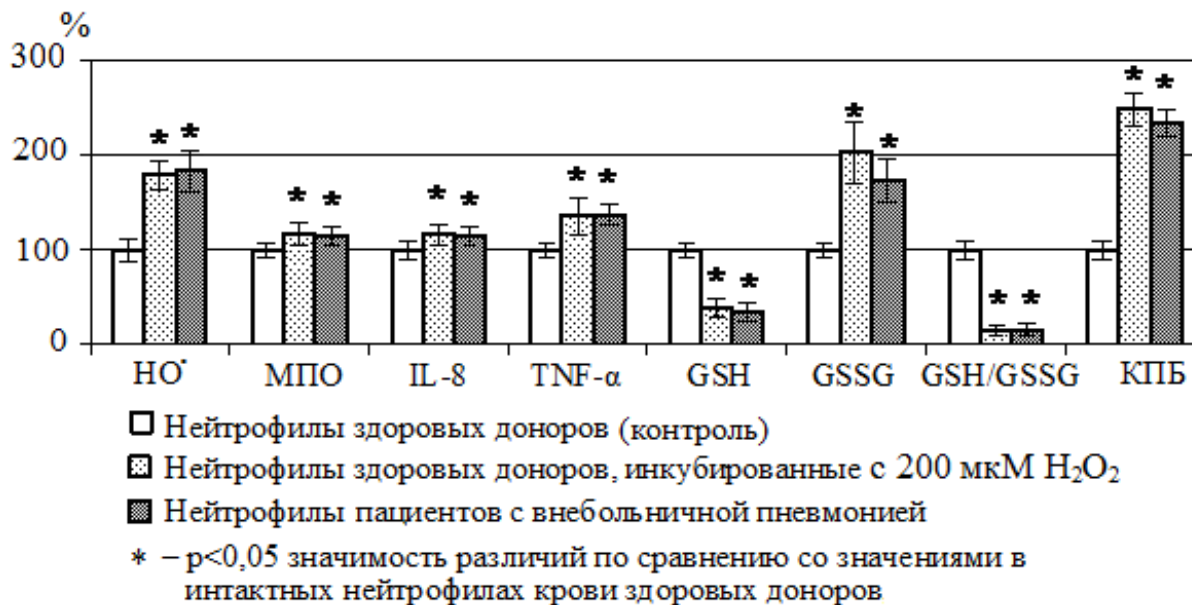


Рис. 2. Параметры функционального состояния, тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков нейтрофильных лейкоцитов крови в условиях окислительного стресса *in vitro* и при внебольничной пневмонии

Основной мишенью АФК в цитозоле клетки являются белки. При ВП и ОС *in vitro* снижение антиоксидантного потенциала глутатиона в нейтрофилах сопровождалось активацией ОМБ – как обратимых ее процессов (снижение содержания Б-SH и увеличение концентрации Б-SSG), так и необратимых (повышение уровня КПБ) (рис. 2). Содержание КПБ в нейтрофилах при моделировании ОС и у больных ВП превышало значения показателя в контрольной группе в 2,5 и 2,3 раза, соответственно ($p < 0,05$). Достоверных различий по этому показателю при ОС *in vitro* и ВП не выявлено ($p > 0,05$). Окислительная модификация Б-SH до Б-SSG вследствие экранирования редокс-чувствительных SH-групп белков глутатионом является неспецифической реакцией и представляет собой часть системы редокс-регуляции в клетке [Дубинина Е.Е., 2006; Зенков Н.К. и соавт., 2009], тогда как накопление не репарируемых КПБ может привести к апоптозу или некрозу [Chen Q. et al., 2003].

Необходимо отметить, что сравнительный анализ данных, характеризующих состояние ТДС (содержание GSH и GSSG, соотношение GSH/GSSG), окислительной модификации белков (содержание Б-SH, Б-SSG и КПБ) и функциональные свойства (активность МПО, продукция НО•, TNF-α и IL-8) нейтрофилов крови, показал, что все величины исследованных параметров у больных ВП статистически значимо не различались с таковыми при ОС,

индуцированном *in vitro*. Полученный факт свидетельствует о том, что использованная нами концентрация H_2O_2 была адекватной для моделирования ОС, сопоставимого с окислительным стрессом, развивающимся при ОБ.

3. Оценка молекулярных механизмов участия тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков в поддержании функционального статуса нейтрофилов крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*

Для исследования молекулярных механизмов влияния ТДС и ОМБ и на функционирование нейтрофилов крови в условиях ОС *in vitro* и при ОБ в среду инкубации клеток добавляли блокатор или протектор свободных SH-групп, или ингибитор синтеза глутатиона *de novo*, а также селективный ингибитор каталазы, учитывая участие ТДС и каталазы в антиоксидантной защите клетки.

Присутствие блокатора SH-групп NEM или ингибитора синтеза глутатиона BSO в среде инкубации нейтрофилов, находящихся в условиях ОС *in vitro* или взятых у больных ВП, приводило одновременно с падением концентрации GSH к снижению ($p < 0,05$) активности МПО и продукции $\cdot OH$ (табл. 4) и накоплению ($p < 0,05$) КПБ в клетках (табл. 5). Недостаток GSH мог привести к индукции окислительной модификации аминокислот и сайт-специфическому повреждению активного центра в молекулах МПО и НАДФН-оксидазы с потерей способности к функционированию. Высказанное предположение косвенно подтверждается наличием выявленной нами положительной корреляционной связи между содержанием GSH в клетках и активностью МПО ($r = 0,70$, $p < 0,05$ – при ОС *in vitro* в присутствии NEM; $r = 0,61$, $p < 0,05$ – при инкубации с BSO нейтрофилов, взятых у больных ВП).

При добавлении ингибитора каталазы АТ в среду инкубации нейтрофилов активность МПО и продукция $\cdot OH$ в клетках также снижались ($p < 0,05$) как в условиях ОС *in vitro*, так и при ОБ (табл. 4), что может быть опосредовано разными механизмами. В частности, на активность МПО могут влиять изменения содержания субстратов и величины рН среды, причем высокие концентрации H_2O_2 прямо повреждают молекулы фермента [Коваленко Е.И. и соавт., 2007], а в отсутствие каталазы был отмечен компенсаторный перерасход GSH (табл. 5). При блокаде каталазы в клетке падает активность ряда чувствительных к окислению ферментов, в том числе супероксиддисмутазы [Байляк М.М. и соавт., 2008], которая синтезирует пероксид водорода, преобразуемый посредством реакции Фентона в $\cdot OH$. Добавление нами протектора SH-групп DTE в среду культивирования нейтрофилов также приводило к снижению продукции $\cdot OH$, повышенной при моделировании ОС *in vitro* и у больных ВП. Восстановленный глутатион и SH-содержащие белки эффективно ингибируют АФК и стабилизируют мембраны клеток [Sies H. et al., 1997; Hayes J.D. et al., 2005; Зенков Н.К. и соавт., 2009; Liu G. et al., 2010]. Одним из механизмов проявления антиоксидантных эффектов GSH в клетке является активное связывание Fe^{2+} и Cu^+ и ограничение реакций Фентона [Zhu Y., 2007].

Таблица 4

Влияние протектора SH-групп 1,4-дитиоэритритола (DTE), блокатора SH-групп N-этилмалеимида (NEM), ингибитора синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимида (BSO) и ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола (AT) на функциональное состояние нейтрофилов крови при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении (Me(Q₁-Q₃), p)

Группы обследованных		·ОН, нмоль/мг	Миело- пероксидаза, усл.ед./мг	IL-8, пг/мл	TNF-α, пг/мл
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	25,32 (19,87-27,60)	715,80 (669,80-741,10)	281,10 (273,71-304,10)	124,52 (89,02-156,00)
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂	45,38 (38,21-70,31) *	846,70 (806,50-986,60) *	334,10 (311,82-352,00) *	170,40 (119,91-188,60) *
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и NEM	24,87 (10,36-46,86) #	636,35 (578,60-673,60) * #	92,95 (77,63-116,01) * #	56,45 (36,20-68,11) * #
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и DTE	23,46 (17,6-32,28) #	697,05 (616,80-772,95) #	309,20 (279,11-326,20) *	105,90 (68,05-126,30) * #
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и BSO	13,31 (12,52-25,34) #	622,75 (544,00-655,35) * #	308,80 (303,62-329,62) *	174,91 (152,40-234,31) *
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и AT	25,97 (18,16-26,94) #	689,10 (676,21-743,30) #	383,60 (331,42-403,21) *	145,40 (132,72-185,11) *
Пациенты с острым воспалением	Интактные нейтрофилы	46,79 (40,64-52,74) *	832,00 (747,80-924,01) *	325,91 (312,91-335,40) *	168,31 (153,27-171,47) *
	Нейтрофилы, инкубированные с NEM	31,10 (22,44-33,95) ^	694,33 (609,40-831,50) ^	255,97 (241,40-280,20) * ^	103,67 (81,61-131,33) ^
	Нейтрофилы, инкубированные с DTE	37,63 (33,72-40,02) * ^	769,50 (645,12-913,49)	305,51 (270,73-371,30)	145,65 (125,23-164,75) * ^
	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	32,56 (24,38-36,64) ^	615,59 (571,89-686,89) * ^	320,50 (290,32-340,12)	153,90 (135,90-164,60) *
	Нейтрофилы, инкубированные с AT	27,44 (18,28-35,05) ^	746,70 (562,9-822,8)	305,51 (270,73-371,30) *	144,60 (125,10-176,90) *

Примечание: * – значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; # – по сравнению с нейтрофилами у здоровых доноров, при инкубации клеток с H₂O₂, p<0,05; ^ – по сравнению с интактными нейтрофилами у больных внебольничной пневмонией, p<0,05

Поддержание восстановительной способности GSH с помощью DTE нормализовало показатель активности МПО, повышенный при индукции ОС *in vitro* и в условиях ВП, до величин в интактных нейтрофилах у здоровых

доноров. Модификация эффективности действия МПО под влиянием DTE указывает на протекторный эффект восстановленных SH-групп в отношении поддержания функций фермента, что подтверждает коэффициент корреляции между содержанием SH-групп и активностью МПО в нейтрофилах, полученных у больных ВП и инкубированных с DTE ($r=0,90$, $p<0,05$).

Результативность взаимодействия нейтрофилов с микроорганизмами определяется интенсивностью проявления той или иной эффекторной функции, одной из которых является продукция цитокинов [Maiani, N.A. et al.; 2003; Малышев И.Ю. и соавт., 2004]. АФК в условиях дисрегуляции окислительных процессов при ОВ осуществляют индукцию синтеза и секреции провоспалительных цитокинов. Действие АФК реализуется посредством активации факторов транскрипции, в том числе NF- κ B, который контролирует синтез ряда цитокинов, молекул адгезии и белков острой фазы, опосредуя регуляцию иммунного ответа, воспалительной реакции и участие в контроле клеточного деления и апоптоза фагоцитирующих клеток [Haddad J., 2002; Kucharczak J. et al., 2003; Bonizzi G., Karin M., 2004]. По данным литературы, при ОС на фоне активации ПОЛ, низкого уровня GSH и высокого содержания GSSG в клетке отмечается фосфорилирование и деградация I κ B и активация NF- κ B, что, повышает скорость транскрипции генов провоспалительных цитокинов [Дубинина Е.Е., 2006; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006].

Изменения продукции TNF- α в условиях ОС наводят на мысль о вовлечении редокс-сигнальных систем в регуляцию синтеза этого цитокина (табл. 4). Нами отмечено наличие отрицательной корреляционной связи между секрецией TNF- α и содержанием белково-связанного глутатиона в нейтрофилах у пациентов с ВП при культивировании клеток в присутствии блокатора SH-групп ($r=-0,82$, $p<0,05$), между продукцией TNF- α и содержанием GSH в условиях модели ОС ($r=-0,58$, $p<0,05$). Наряду с этим в супернатантах культур нейтрофилов, инкубированных с протектором SH-групп DTE, зарегистрировано снижение концентрации TNF- α при ОС *in vitro* и у пациентов с ВП. Известно, что молекулы, обладающие антиоксидантными свойствами, в том числе DTE, препятствуют активации NF- κ B путем снижения эффективности процесса фосфорилирования I κ B, возможно, за счет ингибирования соответствующих киназ [Дубинина Е. Е., 2006], что объясняет пониженную продукцию TNF- α .

С другой стороны, дефицит GSH в случае применения нами блокатора NEM также приводил к снижению продукции IL-8 и TNF- α (табл.4). Активация факторов транскрипции и их связывание с регуляторными сайтами ДНК контролируется редокс-статусом, особенно балансом ТДС, показателем которого служит соотношение восстановленных и окисленных SH-групп [Меньщикова Е. Б. и соавт., 2006]. Для связывания NF- κ B с ДНК необходимо отсутствие в ядре прооксидантной ситуации. В экспериментах *in vitro* было показано, что окисление остатка цистеина в ДНК-связывающем домене NF- κ B до сульфеновой

кислоты сопровождается образованием Б-SSG. Итогом связывания глутатиона с белком становится ингибирование ДНК-связывающей активности [Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007], что могло происходить и в случае применения NEM.

Таблица 5

Влияние протектора SH-групп дитиоэритритола (DTE), блокатора SH-групп N-этилмалеимида (NEM), ингибитора синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимида (BSO) и ингибитора каталазы аминотриазола (AT) на показатели тиолдисульфидной системы и окислительной модификации белков нейтрофилов крови при окислительном стрессе in vitro и остром воспалении (Me(Q₁-Q₃), p)

Группы обследованных		GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	Белок-SSG, нмоль/мг белка	КПБ, пг/мг белка
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	4,84 (4,64-5,39)	0,27 (0,25-0,31)	0,05 (0,03-0,08)	2,85 (2,01-3,29)
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂	1,97 (1,45-2,40) *	0,55 (0,51-0,59) *	0,32 (0,11-0,62) *	7,13 (6,82-8,30) *
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и NEM	1,04 (1,02-1,12) * #	0,57 (0,52-0,64) *	0,37 (0,35-0,38) *	8,03 (7,60-8,78) *
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и DTE	3,18 (3,06-3,40) * #	0,41 (0,38-0,43) * #	0,16 (0,12-0,17) * #	2,87 (2,49-3,18) #
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и BSO	1,15 (1,01-1,16) * #	0,37 (0,35-0,47) * #	0,38 (0,37-0,39) *	9,18 (8,12-10,18) * #
	Нейтрофилы, инкубированные с H ₂ O ₂ и AT	1,23 (1,08-1,63) * #	0,59 (0,56-0,72) *	0,30 (0,28-0,35) *	8,30 (5,08-11,30) *
Пациенты с острым воспалением	Интактные нейтрофилы	1,62 (1,23-1,92) *	0,47 (0,37-0,66) *	0,58 (0,47-0,70) * #	6,68 (5,73-7,94) *
	Нейтрофилы, инкубированные с NEM	1,11 (0,92-1,47) * ^	0,55 (0,52-0,72) * ^	0,77 (0,59-0,87) * ^	8,28 (6,72-9,14) * ^
	Нейтрофилы, инкубированные с DTE	1,80 (1,44-1,96) *	0,49 (0,40-0,62) *	0,55 (0,25-0,66) *	4,49 (3,77-5,09) * ^
	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	0,85 (0,81-0,96) * ^	0,66 (0,57-0,76) * ^	0,65 (0,61-0,70) *	8,49 (7,78-9,02) * ^
	Нейтрофилы, инкубированные с AT	1,33 (1,09-1,71) * ^	0,58 (0,51-0,69) *	0,63 (0,61-0,81) *	8,22 (7,67-8,73) * ^

Примечание: * – значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; # – по сравнению с нейтрофилами у здоровых доноров, при инкубации клеток с H₂O₂, p<0,05; ^ – по сравнению с интактными нейтрофилами у больных внебольничной пневмонией, p<0,05; КПБ – карбонильные производные белков.

Антиоксидантная защита нейтрофилов, основным компонентом которой выступает ТДС, ограничивает окислительный потенциал АФК. Эффекты ферментов и неферментативных антиоксидантов ТДС тесно связаны и сбалансированы между собой, что способствует поддержанию и четкой регуляции редокс-состояния клеток [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Kiley P.J., 2004]. Снижение концентрации GSH в нейтрофилах при ОС *in vitro* и остром воспалении (табл. 5) во многом обусловлено расходом тиола для обратимого связывания с SH-группами белков, которые в прооксидантной ситуации подвергаются окислению АФК в первую очередь. В нашем исследовании величина соотношения GSH/GSSG в нейтрофилах была снижена как у больных ВП, так и при ОС *in vitro*. Это указывает на снижение восстановительного потенциала редокс-системы глутатиона и, соответственно, ее протекторной роли в отношении обратимой модификации белковых молекул.

Снижение концентрации GSH, несущего около 90 % свободных SH-групп клетки, приводит к повышению доступности мембран для токсического действия продуктов ПОЛ [Day R.M., 2005; Reed M.C., 2008]. Нами отмечен рост содержания метаболитов ПОЛ в мембране эритроцитов и плазме крови при ВП ($r=-0,59$, $p<0,05$ – коэффициент корреляции между содержанием GSH в нейтрофилах и концентрацией ТБК-РП в плазме крови у больных ВП). Снижение содержания GSH в нейтрофилах у больных ВП объясняется не только расходом его SH-групп для защиты от $\cdot\text{OH}$ и других АФК, но и интенсивным использованием для ГПО [Fuchs T.A., 2007, Меньщикова Е.Б. и соавт., 2008]. Однако сами АФК, в частности $\cdot\text{OH}$, могут ингибировать ГПО [Pigeolet E., Remacle J., 1991]. Активность ГПО в нейтрофилах при ВП, была снижена в 1,6 раза, при экспериментальном ОС – в 2,2 раза по сравнению с таковой в клетках у здоровых доноров [160,6 (132,60-174,20) нмоль/(мин·мг белка)] ($p<0,05$).

При инкубации нейтрофилов с NEM или BSO отмечен дефицит GSH, являющегося субстратом ГПО, что вызывало снижение активности данного фермента в практически в 2,0 раза в обоих случаях при ОС *in vitro* ($p<0,05$) и в 1,7 и 2,5 раза, соответственно, в условиях ВП ($p<0,05$). Кроме того, выключение эффектов каталазы ингибитором АТ приводило к компенсаторному росту активности ГПО в клетках с индуцированным ОС в 1,7 раза ($p<0,05$). Однако при ВП под действием АТ активность ГПО снижалась в 1,7 раза ($p<0,05$), как и содержание GSH – в 1,2 раза ($p<0,05$) на фоне стабильности иных показателей нейтрофилов. Действие DTE на нейтрофилы не изменяло активность ГПО в условиях модели ОС и повышало в 1,2 раза у пациентов с ВП ($p<0,05$). Вероятно, при ВП восстановительный потенциал DTE расходовался клетками для поддержания редокс-состояния ТДС, а неиспользованные молекулы GSH могли направляться на обратимое экранирование функционально активных SH-групп белков (образование Б-SSG) и поддержание активности ГПО: при ОБ оба показателя были выше таковых при ОС *in vitro* в 1,6 и 1,4 раза, соответственно ($p<0,05$).

Снижение восстановительного потенциала ТДС при ОС может усугублять процессы окислительной деградации липидных и белковых молекул клеток. Оценка параметров ОМБ белков в нейтрофилах крови у пациентов с ВП и при моделировании ОС на клетках у здоровых доноров, показала увеличение содержания карбонильных производных белков (табл. 5). Большое количество карбонильных соединений, связанных с деградацией белков, образуется в результате металл-катализируемого окисления и при воздействии гипохлорита, что характерно для острых воспалительных заболеваний [Дубинина Е.Е., 2006]. Подтверждением данного положения служит наличие корреляционной связи между активностью МПО и содержанием КПБ в нейтрофилах ($r=0,74$, $p<0,05$ – при экспериментальном ОС, $r=0,76$, $p<0,05$ – при внебольничной пневмонии).

Усиление окисления белков на фоне низкого содержания восстановленных эквивалентов в нейтрофилах, культивированных с BSO или АТ при ВП и ОС *in vitro*, а также при инкубации с NEM нейтрофилов, полученных у пациентов с ВП, вероятно, связано с дисбалансом системы про-/антиоксиданты в эффекторных клетках ОВ. Это подтверждается наличием отрицательной корреляционной связи между содержанием GSH и КПБ в нейтрофилах у больных ВП ($r=-0,72$, $p<0,05$), а также между величиной соотношения GSH/GSSG и уровнем КПБ ($r=-0,88$, $p<0,05$) в условиях модели ОС *in vitro*. Ингибирование синтеза GSH в нейтрофилах нарушает образование дисульфидов Б-SSG, которые сохраняют SH-группы белков от необратимого окисления. В наших исследованиях содержание КПБ было максимально повышено в нейтрофилах, инкубированных с BSO, когда в условиях отсутствия синтеза GSH *de novo* не отмечалось дополнительного образования Б-SSG.

Таким образом, у пациентов с ВП и при моделировании ОС *in vitro* существенная роль в антиоксидантной защите принадлежит ТДС, редокс-потенциал которой основан на GSH и является базовым фактором защиты SH-групп белков от необратимого окислительного повреждения. Окислительные модификации, как модулирующие активность протеинов, в частности глутатионилирование, так и необратимое карбонилирование белков, могут участвовать в механизмах изменений и нарушений функциональных свойств нейтрофилов крови (активность МПО, продукция $\cdot\text{OH}$, TNF- α и IL-8). Низкое содержание GSH и снижение скорости его регенерации из GSSG в нейтрофилах повышают степень риска необратимого окислительного повреждения белков, следствием чего является нарушение их функциональной активности [Berlett B.S., Stadtman E.R., 1997; Ramirez D.C. et al., 2005]. В частности, ингибирование каталазы или синтеза глутатиона в нейтрофилах крови сопровождается снижением активности МПО и способности продуцировать $\cdot\text{OH}$, которые так необходимы для обеспечения микробицидной функции. Кроме того, ОМБ меняет антигенные свойства белков, а активация ПОЛ способствует синтезу хемоаттрактантов, увеличивающих миграцию фагоцитов в очаг ОВ.

Воспаление представляет собой сложный многокомпонентный процесс и можно полагать, что в активацию продукции TNF- α и IL-8 нейтрофилами при внебольничной пневмонии и экспериментальном ОС могут быть вовлечены и многие факторы (цАМФ, цГМФ, ионы Ca, активные метаболиты арахидоновой кислоты и др.), выступающие универсальными регуляторами клеточного метаболизма [Rossi A.G. et al., 1998; Дубинина Е.Е., 2008]. В частности, истощение внутриклеточного пула свободных и протеинсвязанных тиолов приводит к нарушению гомеостаза кальция и увеличению его концентрации в цитозоле, в результате чего активируются Ca²⁺-зависимые гидролитические ферменты (протеазы, фосфолипазы, эндонуклеазы), и, как следствие, необратимо повреждаются клеточные структуры [Yermolaieva O., 2000].

В данной ситуации при защите нейтрофилов от ОС, развивающегося в эксперименте и при ОВ, молекулы GSH, вероятно, перераспределяются в клетке с целью оказания протекторного влияния на функционально значимые белки, в том числе путем обратимого глутатионилирования свободных тиоловых групп. Вероятно, подобная оптимизация ТДС в пользу одних протекторных механизмов осуществляется за счет ограничения других и направлена на сохранение эффективности функционирования нейтрофилов в условиях окислительного дисбаланса (рис. 3). Процессы адаптации нейтрофилов к экстремальным условиям ОВ, скорее всего, связаны с повышением H₂O₂-деградирующей активности и оптимальным распределением таковой среди антиперекисных ферментов, что осуществляется посредством активации фактора транскрипции NF- κ B и роста экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты, ограничивающих реакции ОМБ и ПОЛ.

Избыток АФК способствует повреждению ДНК и нарушению считывания информации, а модифицированная м-РНК опосредует синтез белков с измененными физико-химическими свойствами, в итоге меняется метаболизм и структурно-функциональный статус клетки. Выраженные нарушения каталитических способностей и процессов репарации белков могут приводить к активации апоптоза клетки, а дальнейший рост деструкции протеинов – к некротическому лизису [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Ciricu C.L., Stringer S. et al., 2009]. При этом окислительное повреждение и фрагментация ДНК сами являются танатогенными стимулами, а сегментированность ядра нейтрофильных лейкоцитов указывает на их предрасположенность к активации апоптоза.

В целом, в очаге ОВ нейтрофилы оказываются «заложниками» своей способности к гиперпродукции АФК, которые вызывают формирование выраженного ОС. Избыток АФК в нейтрофилах потенцирует необратимое повреждение макромолекул, рост проницаемости мембран, выход в цитозоль Ca²⁺ и проапоптотических факторов, приводящих к быстрой элиминации клеток, ставших функционально неполноценными. При этом нет однозначного ответа на вопрос – ОС является следствием или индуктором морфо-функциональных изменений,

сопровождаящих развитие апоптоза [Болдырев А.А., 1999; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. Очевидно, что различные АФК прямо или опосредованно участвуют в механизмах развития апоптоза. В частности накопление H_2O_2 активирует запуск апоптоза клеток *in vitro* – нейтрофилов, лимфоцитов, эндотелиоцитов и др. [Simon H.U. et al., 2000; Cumming R.C. et al., 2004].

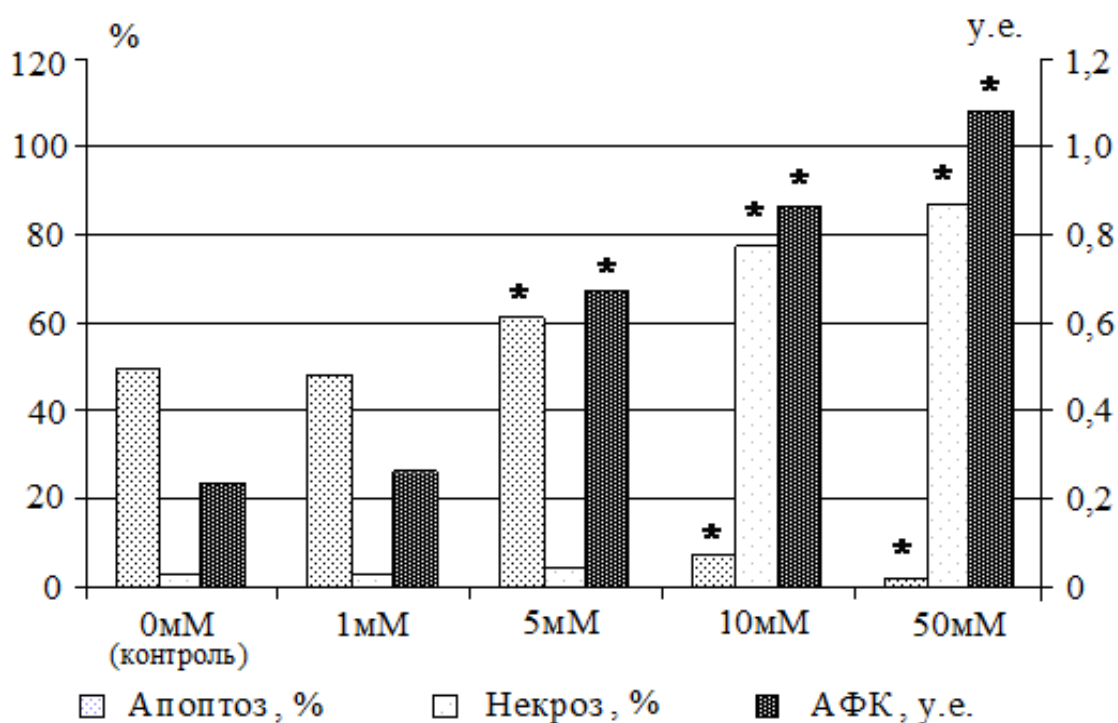


Рис. 3. Сценарии развития окислительного стресса в нейтрофилах и функциональная активность клеток при остром воспалении (по данным А.В. Girotti, 1998, Е.Е. Дубининой, 2006, А. Català, 2009, и собственным результатам)

4. Особенности апоптоза и продукции активных форм кислорода нейтрофилами крови, влияние оксида азота на программированную гибель нейтрофилов при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении

Известно, что концентрации пероксида водорода от 1 мМ и выше могут активировать запуск апоптоза в культуре клеток (в зависимости от типа клеток) [Cumming R. C. et al., 2004], но в научной литературе фактически отсутствуют данные, показывающие изменения в метаболизме нейтрофилов в зависимости от концентрации H_2O_2 *in vitro*. Наряду с этим для индикации фенотипических проявлений апоптоза и некроза клеток используются разнообразные способы, что в нашем случае определило необходимость экспериментального подбора оптимальной концентрации H_2O_2 , способной эффективно индуцировать как ОС, так и программированную гибель нейтрофильных лейкоцитов.

Для моделирования ОС *in vitro* нейтрофилы, полученные из крови здоровых доноров, инкубировали с H_2O_2 в конечной концентрации 1, 5, 10 и 50 мМ. С помощью данных экспериментов мы выявляли конечную концентрацию H_2O_2 , которая одновременно с нарастанием внутриклеточного содержания АФК вызывала в культуре клеток индукцию апоптоза наибольшего числа нейтрофилов без увеличения количества некротически измененных (рис. 4). Нашим требованиям в полной мере удовлетворяли лишь те результаты, что были получены при использовании 5 мМ концентрации H_2O_2 .



* – $p < 0,05$ значимость различий по сравнению с аналогичным показателем в контроле (интактные культуры нейтрофилов крови здоровых доноров)

Рис. 4. Внутриклеточное содержание активных форм кислорода (АФК), число клеток в состоянии апоптоза и некроза в культурах нейтрофилов крови у здоровых доноров при добавлении в среду инкубации разных концентраций H_2O_2

Выбранную модель ОС (5 мМ Н₂О₂) мы сравнивали по ключевым показателям (продукция АФК и реализация апоптоза) с окислительным стрессом, возникающим при ОВЗ (рис. 5). В эксперименте и при оценке клинического материала обнаружено статистически равнозначное увеличение содержания АФК в нейтрофилах [0,678(0,596–0,705) усл.ед. – при ОС *in vitro*, 0,653(0,574–0,728) усл.ед. – при ВП, 0,673(0,561–0,690) усл.ед – при ОА] а также количества апоптотических клеток [61,10(57,80–67,50), 62,37(54,25–69,20) и 57,40(51,37–62,37)%, соответственно] относительно таковых в контроле (p<0,05). Это указывает на близкие механизмы активации апоптоза клеток, полученных у здоровых доноров и инкубируемых с 5 мМ Н₂О₂, и нейтрофилов, взятых у пациентов с ОВЗ. Влияние АФК на развитие апоптоза подтверждалось наличием тесной корреляционной связи между увеличением внутриклеточного уровня АФК и количества апоптотических клеток в культурах нейтрофилов с ОС *in vitro* (r=0,89, p<0,05), а также в культурах клеток, полученных у больных ОВЗ (r=0,71, p<0,05). В целом, приведенные факты показывают адекватность подобранной концентрации Н₂О₂ и используемой нами модели ОС для имитации редокс-состояния нейтрофилов в условиях ОВ, когда происходит индукция программы апоптоза без активации некротических изменений клетки.

Вместе с тем, в среде инкубации нейтрофилов нами отмечен прирост содержания метаболитов NO в сравнении с контролем [0,108(0,106–0,110) мкМ]

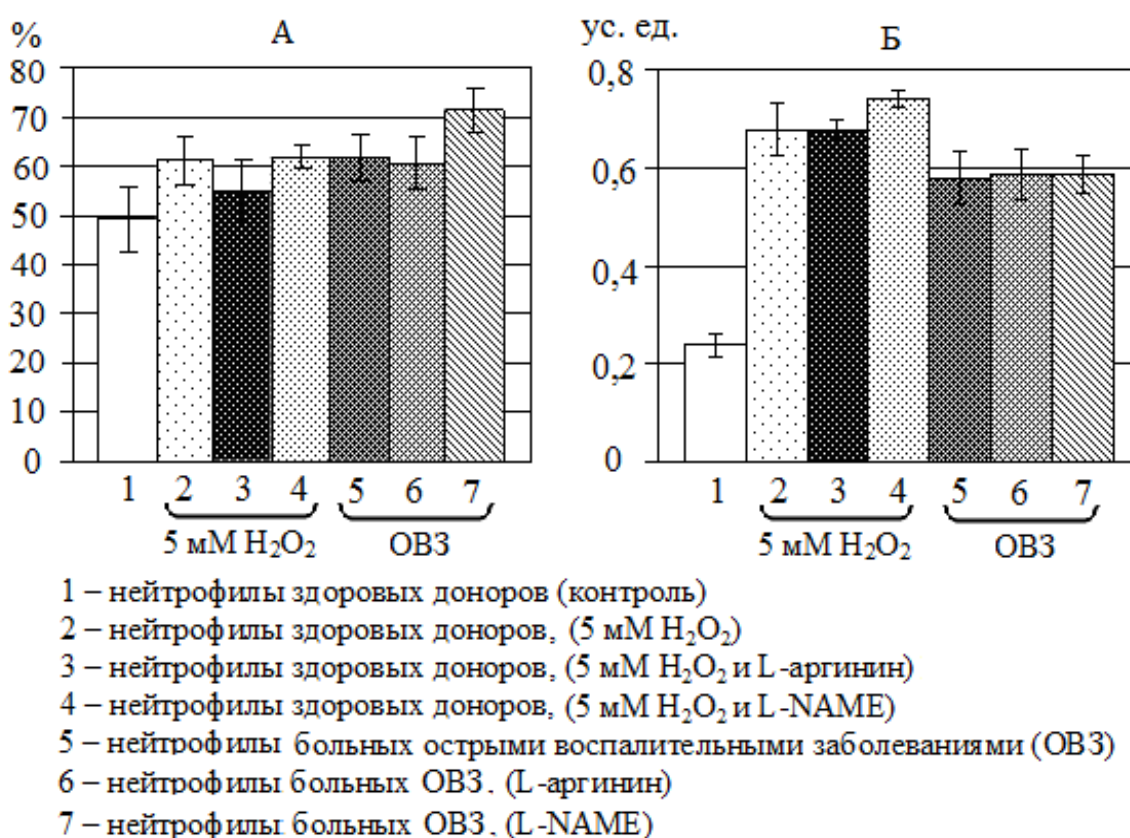


Рис 5. Апоптоз (А) и внутриклеточное содержание активных форм кислорода (Б) в нейтрофилах при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* в условиях индукции и ингибирования синтеза NO

($p < 0,05$) в условиях ОС *in vitro* – до 0,121 (0,120–0,132) мкМ и, в относительно большей степени ($p < 0,05$), при ОВЗ – до 0,157 (0,153–0,161) мкМ (рис. 6). Полученные данные указывают на увеличение продукции оксида азота нейтрофилами при ОС и дополнительную стимуляцию синтеза NO при ОВ. По данным литературы, во время развития ОВ под действием провоспалительных цитокинов резко повышается экспрессия индуцибельной NO-синтазы и реализация эффектов оксида азота в клетках [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2000; Choi V.-M. et al., 2002; Сомова Л.М., Плехова Н.Г., 2006], результатом чего мог стать рост уровня конечных метаболитов NO в среде инкубации нейтрофилов. Это может быть закономерным следствием универсальной роли молекул NO в развитии ОВ: регуляция тонуса сосудов, фагоцитарной активности и биоэнергетики клеток, экспрессии ферментов и факторов транскрипции, ответственных за апоптоз и пролиферацию [Маеда Х., Акаике Т., 1998; Gong L. et al., 2004; Tuteja N. et al., 2004].

Выяснение роли NO в механизмах регуляции апоптоза нейтрофилов при ОС *in vitro* (5 мМ H_2O_2) и ОВ проводили с помощью добавления в среду инкубации клеток индуктора или ингибитора NO-синтаз. В присутствии L-аргинина отмечался прирост концентрации конечных метаболитов NO в среде инкубации нейтрофилов как в условиях модели ОС, так и при ОВЗ. Добавление ингибитора L-NAME приводило к снижению этого показателя до значений контроля в случае модели ОС, а при ОВЗ данный эффект отсутствовал – продукция метаболитов NO нейтрофилами оставалась на уровне, характерном для клеток пациентов с острым воспалением и превышающем таковой при ОС *in vitro*. Данный факт свидетельствует не только об активации NO-синтазы в условиях воспалительного процесса, но и о запуске неферментативных механизмов наработки NO, не чувствительных к воздействию L-NAME [Реутов В.П. и соавт., 1998; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2000; Veltran V. et al. 2000 и 2002].

L-аргинин не влиял на содержание АФК в цитозоле нейтрофилов ни при ОС *in vitro*, ни у пациентов с ОВЗ, и, вместе с тем, эффективно снижал (до значений контроля) процент апоптотических клеток в культурах с моделированием ОС, не оказывая значимого влияния на апоптоз нейтрофилов крови у пациентов с ОВЗ. Предположение о возможном стабилизирующем влиянии NO на развитие апоптоза нейтрофилов подтверждается наличием обратной корреляционной зависимости между концентрацией метаболитов NO в среде инкубации и числом апоптотических клеток как в случае ОС, индуцированного 5 мМ H_2O_2 ($r = -0,83$, $p < 0,05$), так и при ОВЗ ($r = -0,59$, $p < 0,05$).

Рост концентрации АФК в цитозоле нейтрофилов был зарегистрирован при действии L-NAME в условиях модели ОС, отсутствуя при ОВЗ, тогда как число апоптотических нейтрофилов, наоборот, увеличивалось при ОВ и не изменялось при ОС *in vitro*. Действие L-NAME отменяло эффекты NO в плане ограничения реализации апоптоза, а рост содержания АФК на фоне ОС *in vitro* указывал на отсутствие сдерживающего влияния NO на генерацию АФК в клетке.

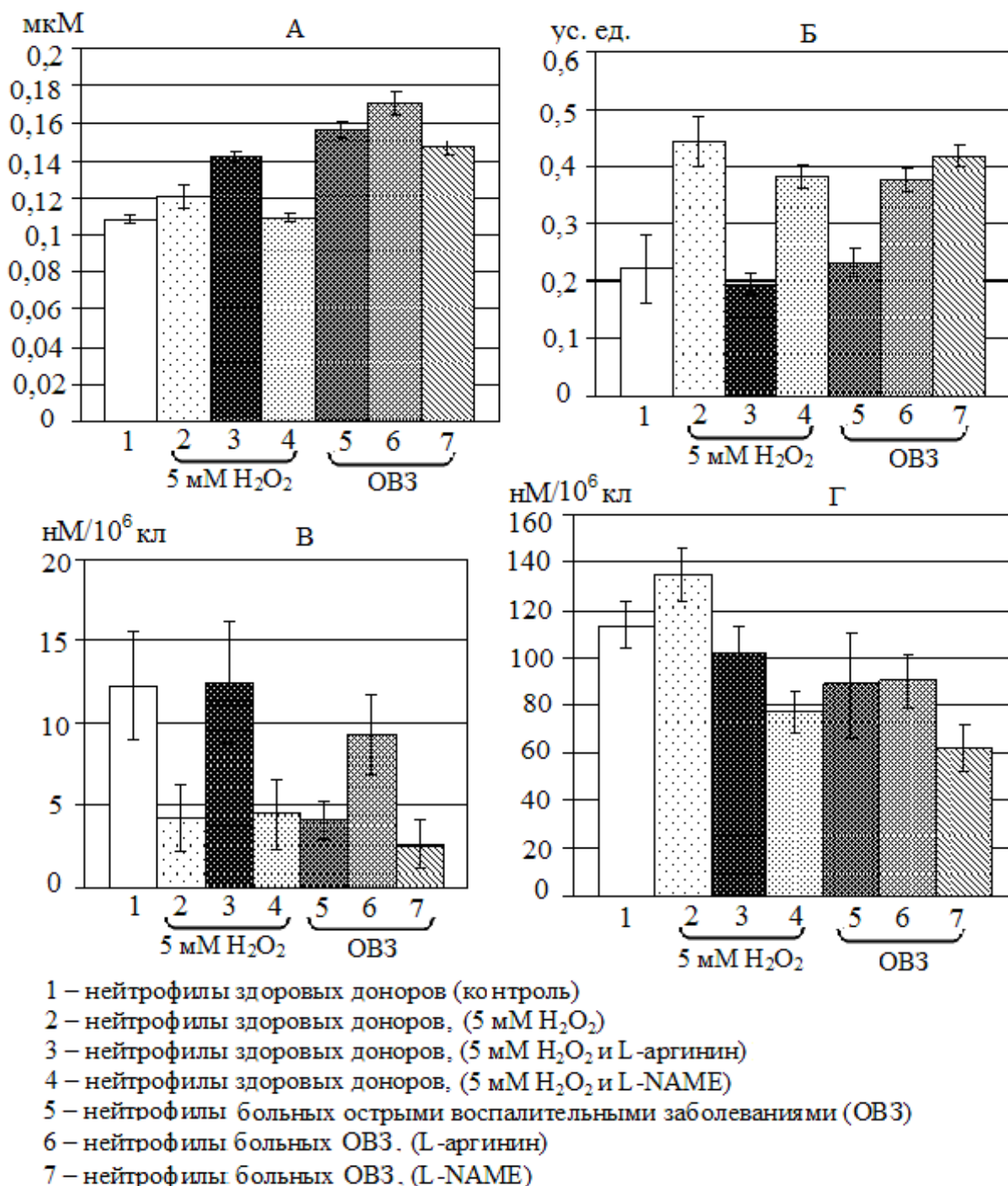


Рис 6. Содержание метаболитов NO в среде инкубации (А), ионов кальция (Б) и циклических нуклеотидов (цАМФ (В) и цГМФ (Г)) в нейтрофилах крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* в условиях индукции и ингибирования синтеза NO

Таким образом, в наших исследованиях установлено, что индукция синтеза NO сопровождается угнетением апоптоза нейтрофилов крови в условиях ОС *in vitro*, а ингибирование NO-синтаз способствует программированной гибели этих клеток при ОС, как формирующемся при ОВЗ, так и создаваемом с помощью 5 mM H₂O₂. Следовательно, на основании полученных результатов можно предполагать наличие в арсенале оксида азота способности

ограничивать механизмы реализации апоптоза нейтрофилов в условиях ОС, но трудно сделать вывод о том, является ли NO протекторным агентом непосредственно или стимулирует механизмы защиты клетки от повреждения (рис. 7). Обнаружение молекулярных механизмов реализации запрограммированной гибели в ответ на повышение или снижение концентрации NO в клетке при ОС позволит не только выявить молекулярные мишени влияния NO на апоптоз нейтрофилов периферической крови, но и предположить схожие механизмы участия оксида азота в развитии гибели нейтрофилов в очаге воспаления.

5. Молекулярные механизмы управления апоптозом нейтрофилов крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro*

Оксид азота известен как важный компонент окислительного стресса и, одновременно, он выступает важнейшим медиатором, способным напрямую влиять на внутриклеточные метаболические процессы без участия каких-либо мессенджеров [Ванин А.Ф., 2000; Зенков Н.К. и соавт., 2001; Tuteja N. et al., 2004], а также посредством подключения таковых [De Nadai C. et al., 2000; Choi B.-M. et al., 2002]. Для идентификации молекулярных мишеней регуляторного воздействия NO на апоптоз нейтрофилов в первую очередь необходимо было оценить причинно-следственные связи каскадных реакций передачи внутриклеточных сигналов, поэтому наши исследования были направлены на оценку изменения концентрации внутриклеточных мессенджеров (цГМФ, цАМФ и Ca^{2+}) в нейтрофильных гранулоцитах при развитии ОС.

Концентрация цАМФ и цГМФ в нейтрофилах при инкубации с 5 мМ H_2O_2 изменялась разнонаправленно: содержание цАМФ возрастало в 1,2 раза, а цГМФ снижалось в 3,0 раза относительно соответствующих показателей в клетках у здоровых доноров [114,13(101,96–120,55) и 12,25(10,48–17,04) нМ/10⁶ кл] ($p < 0,05$), что приводило к увеличению соотношения цАМФ/цГМФ в 3,4 раза по сравнению с таковым в контроле ($p < 0,05$).

При ОВ концентрация цАМФ в нейтрофилах была ниже величины аналогичного параметра в интактной культуре клеток у здоровых доноров – в 1,3 раза ($p < 0,05$), в клетках с моделированием ОС *in vitro* – в 1,5 раза ($p < 0,05$). Содержание цГМФ также было ниже соответствующего параметра в контроле ($p < 0,05$), но достигало уровня, близкого к таковому при ОС *in vitro* (рис. 6). Выраженное снижение концентрации цГМФ в нейтрофилах, полученных у лиц с ОВЗ, обеспечило рост соотношения цАМФ/цГМФ в клетке в 2,0 раза. Рост соотношения цАМФ/цГМФ на фоне активации запрограммированной гибели нейтрофилов в условиях ОВ, скорее всего, носит защитно-приспособительный характер. Данные о влиянии цАМФ на апоптоз нейтрофилов малочисленны и указывают, что регуляция программы клеточной гибели системой циклических нуклеотидов носит тканеспецифический характер [Chang H.S. et al., 2000; Kato T. et al., 2006]. Биологическая роль повышения концентрации цАМФ в нейтрофилах при ОВЗ может быть связана со способностью данного

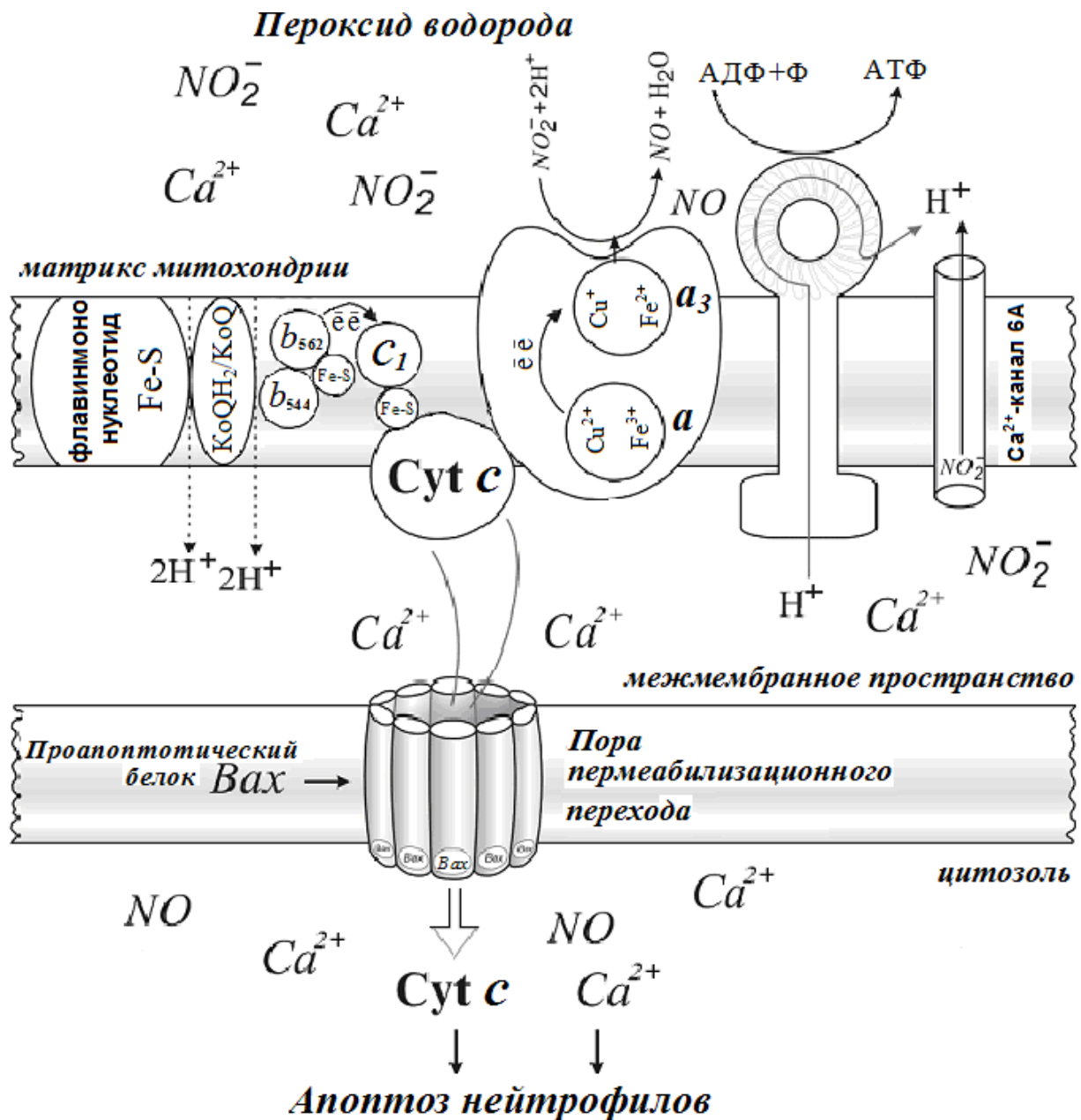


Рис. 7. Влияние оксида азота на реализацию запрограммированной гибели нейтрофилов в условиях окислительного стресса (по данным В.П. Реутова и соавт., 1998, Н.А. Маянского, 2004, E. Basso et al., 2005, и результатам собственных исследований)

циклического нуклеотида участвовать в подавлении фагоцитоза нейтрофилов макрофагами в очаге воспаления [Rossi A.G. et al., 1998].

Воздействие индуктора NO-синтаз L-аргинина на нейтрофилы, полученные у больных ОВЗ, не изменяло концентрацию цАМФ относительно собственного базального уровня ($p > 0,05$), но сопровождалось ростом содержания цГМФ в клетках в 2,3 раза ($p < 0,05$), приводящим к снижению отношения цАМФ/цГМФ. Повышение содержания цГМФ, на наш взгляд, может быть напрямую связано со стимуляцией растворимой гуанилатциклазы оксидом азота [Hanafy K.A., 2001; Bian K., 2006]. Использование индукции NO с помощью 500 мкМ L-аргинина в условиях ОС *in vitro* способствовало снижению внутриклеточного

содержания цАМФ ($p < 0,05$) и увеличению концентрации цГМФ в нейтрофилах до значений контроля ($p > 0,05$). Рост содержания цГМФ в 3,0 раза относительно базового уровня в нейтрофильных гранулоцитах обеспечил снижение соотношения цАМФ/цГМФ до контрольных величин.

Приведенная выше краткая интерпретация результатов собственных исследований и анализ данных других авторов [De Nadai C. et al., 2000; Choi B.-M. et al., 2002; Maianski N.A. et al., 2004], позволили предположить, что оксид азота посредством увеличения концентрации цГМФ снижает соотношение циклических нуклеотидов в клетке до значений, близких к контрольным, стабилизируя, тем самым, метаболизм нейтрофилов и продлевая жизнь клетки. Способность L-аргинина подавлять развитие апоптоза в случае экспериментального ОС связана, по всей вероятности, с цитопротекторными эффектами NO, который посредством цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу G, что приводит к снижению цитоплазматической концентрации ионов кальция, играющих ключевую роль в реализации апоптоза.

Добавление в среду инкубации нейтрофилов ингибитора L-NAME приводило в условиях ОС *in vitro* к достоверному ($p < 0,05$) снижению внутриклеточной концентрации цАМФ в 1,5 раза, цГМФ – в 3,0 раза (рис. 6). Воздействие ингибитора NO-синтазы на нейтрофильные гранулоциты при ОБЗ сопровождалось снижением содержания цАМФ в 1,4 раза, цГМФ – в 1,6 раза относительно базового уровня ($p < 0,05$). В обоих случаях этому сопутствовало увеличение соотношения концентраций данных нуклеотидов.

Рост соотношения цАМФ/цГМФ в нейтрофилах, культивированных с 5 мМ H_2O_2 и L-NAME, может быть связан с токсическим влиянием пероксида водорода на аденилатциклазу и гуанилатциклазу, которое усиливается при отсутствии стабилизирующего влияния NO на дыхательную цепь митохондрий [Beltran B. et al. 2000, 2002]. Напомним, что введение в культуральную среду L-NAME приводило к росту концентрации внутриклеточных АФК и усугубляло развитие ОС. Изменение соотношения цАМФ/цГМФ при культивировании нейтрофилов, полученных у больных ОБЗ, с селективным ингибитором NO-синтазы происходило на фоне увеличения количества апоптотических клеток. Скорее всего, рост соотношения цАМФ/цГМФ в клетке при развитии апоптоза носит транзиторный характер, связанный с нормализацией метаболизма клеток и предотвращением гибели нейтрофилов. В свою очередь, одним из эффектов цАМФ является рост концентрации ионов кальция в цитоплазме, что указывает на функциональную взаимосвязь вторичных мессенджеров – цАМФ и Ca^{2+} .

В наших исследованиях рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток в 2,0 раза, по сравнению с соответствующим параметром в контроле [0,220(0,114–0,234) усл.ед.] ($p < 0,05$), отмечен только при моделировании ОС 5 мМ H_2O_2 , а при ОБ данный показатель значимо не изменялся (рис. 5). При этом в

нейтрофилах, полученных у пациентов с ОВ, концентрация внутриклеточного кальция была в 1,9 раза ниже таковой при индукции ОС ($p < 0,05$).

Существуют данные, указывающие на взаимосвязь изменений концентрации свободного кальция в клетке с системами образования и утилизации АФК [Yermolaieva O. et al., 2000, 2003]. Повышение уровня внутриклеточного кальция в нейтрофилах при воздействии 5 мМ H_2O_2 может быть следствием стимулирующего влияния АФК на высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Вместе с тем ионы Ca инициируют перестройку липидного матрикса мембраны митохондрии, приводящую к дезорганизации компонентов дыхательной цепи и повышению продукции АФК в клетке. Следует отметить, что генерация H_2O_2 усиливается при повышении концентрации цитозольного кальция, а также по мере увеличения концентрации свободных ионов кальция вне клетки.

Культивирование нейтрофилов с индуктором NO-синтаз L-аргинином полностью до значений контроля ($p > 0,05$) нивелировало в клетках повышение концентрации Ca^{2+} , формирующееся в условиях ОС *in vitro*. Учитывая ЭПР, митохондрии – основное депо Ca^{2+} среди клеточных компартментов, поэтому по изменению содержания этого иона в цитоплазме можно косвенно судить о митохондриальной дисфункции. Возможно, снижение концентрации Ca^{2+} в нейтрофилах под действием NO при ОС *in vitro* происходило за счет стабилизирующего влияния NO на проницаемость мембраны митохондрий [Реутов В.П. и соавт., 1998; Brune B., 1999; Beltran B. et al., 2000, 2002]. Вместе с тем в нейтрофилах, полученных у больных ОВЗ, внутриклеточный уровень Ca^{2+} , изначально не отличавшийся от контрольного, под влиянием L-аргинина увеличивался в 1,6 раза ($p < 0,05$), оставаясь все же ниже такового при культивировании с селективным ингибитором NO-синтазы ($p < 0,05$) и на фоне ОС *in vitro* ($p < 0,05$). Кроме того, в наших исследованиях воздействие ингибитора NO-синтазы L-NAME на нейтрофилы, взятые у пациентов с ОВЗ, вызывало вместе с повышением уровня внутриклеточного кальция рост числа аннексин-положительных клеток. В нашем случае предположение о подавлении развития апоптотической программы нейтрофилов оксидом азота за счет снижения выхода Ca^{2+} из митохондрий подтверждено обратной корреляционной связью между концентрацией метаболитов NO и уровнем внутриклеточного кальция при ОС *in vitro* ($r = -0,79$, $p < 0,05$) и на фоне ОВЗ ($r = -0,57$, $p < 0,05$).

Активные формы кислорода и кальций могут действовать совместно, индуцируя повышение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны (образование гигантских пор пермеабилитационного перехода). Имеются сведения о способности оксида азота предотвращать открытие гигантских пор митохондрии, блокируя тем самым выход ионов Ca, цитохрома c в цитоплазму и предотвращая запуск каспазного каскада [Brookes P.S. et al., 2000]. Одним из важных регуляторов проницаемости наружной мембраны

митохондрий и развития программированной гибели клеток является семейство белков Bcl-2. Проницаемость пор зависит от соотношения про- (Bax) и антиапоптотического (Bcl-2) белков этого семейства [Ravagnan L. et al., 1999; Smaili S.S. et. al., 2000; Sun J. et. al., 2010]. Логично предположить, что мишенью NO при реализации регуляторных эффектов могут быть белковые молекулы, как потенцирующие открытие пор, так и участвующие в поддержании целостности мембраны митохондрий с целью обеспечения жизнеспособности нейтрофилов в условиях ОВ. Далее гипотезу оценивали на модели ОС *in vitro*, поскольку в этом случае был более выражен антиапоптотический эффект NO в отношении нейтрофилов, показанный выше при индукции NO-синтаз .

При оценке содержания проапоптотического белка Bax в нейтрофилах нами было обнаружено его увеличение как при ОС *in vitro*, так и у больных ОВЗ по сравнению с таковым в контроле ($p < 0,05$). Воздействие L-аргинина и L-NAME на нейтрофилы, культивированные в присутствии 5 мМ H₂O₂, в обоих случаях не изменяло содержания белка Bax по сравнению с аналогичным показателем, регистрируемым в отсутствие индуктора и ингибитора. Исследование содержания антиапоптотического протеина Bcl-2 в нейтрофилах не выявило данного белка ни при моделировании ОС *in vitro*, ни при остром воспалении. Это согласуется с данными литературы [Edward S.W. et al., 2003] и указывает на необратимость запуска танатогенной программы нейтрофилов. Соответственно, наличие L-аргинина или L-NAME не могло повлиять на данный показатель в условиях экспериментального окислительного стресса.

Полученные нами результаты свидетельствуют не только об отсутствии влияния NO на регуляторные транскрипционные механизмы синтеза белков Bax и Bcl-2 при используемых нами условиях ОС, но и об отсутствии у NO способности изменять функциональные свойства Bax путем нитрозилирования, показанного для ряда других белков митохондриальных мембран [Alonso D. et al., 2002; Daniel P.T. et al., 2003]. Резюмируя, можно заключить, что молекулы NO ограничивают реализацию апоптоза нейтрофилов при остром воспалении и индукции ОС *in vitro* 5 мМ H₂O₂, изменяя внутриклеточную концентрацию вторичных мессенджеров (цГМФ, цАМФ и Ca²⁺), вне зависимости от наличия и концентрации про- (Bax) и антиапоптотических (Bcl-2) белков.

В целом, полученные в ходе исследования результаты представляют собой теоретическую основу для последующей разработки методов профилактики, диагностики и коррекции острых воспалительных процессов, связанных с развитием окислительного стресса. Разработка методологии редокс-регуляции на уровне системы тиолдисульфидных антиоксидантов может стать основой для создания селективных технологий управления нейтрофилами при остром воспалении, нацеленных на оптимизацию функционирования эффекторных клеток и ограничение аутоксических эффектов, приводящих к чрезмерно быстрой апоптотической элиминации. Изучение взаимосвязи внутриклеточных

сигнальных путей, участвующих в реализации запрограммированной гибели нейтрофилов в условиях окислительного стресса, показало важную роль оксида азота в системе вторичных мессенджеров, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность и функционирование клетки. Дальнейшая идентификация молекулярных мишеней действия оксида азота позволит уточнить механизмы регуляции клеточных функций, что в конечном итоге будет способствовать разработке подходов управления апоптозом клетки при широком спектре патологических процессов, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

Выводы

1. В условиях развития окислительного стресса, возникающего при острых воспалительных заболеваниях (внебольничной пневмонии, остром аппендиците) и индукции *in vitro* 200 мкМ пероксидом водорода, нарушения функционального статуса нейтрофильных лейкоцитов крови характеризуются увеличением активности миелопероксидазы, продукции гидроксильного радикала и провоспалительных цитокинов (IL-8 и TNF- α).

2. При окислительном стрессе, развивающемся при острых воспалительных заболеваниях, в мембране эритроцитов возрастает содержание метаболитов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) и снижается активность Na⁺/K⁺-АТФазы, что сопровождается нарушением редокс-баланса в плазме крови: повышением концентрации ТБК-реагирующих продуктов и церулоплазмينا на фоне угнетения активности каталазы. Проявления окислительного стресса при различиях в клинической картине острых очаговых воспалительных заболеваний (моно- и полисегментарная внебольничная пневмония с альвеолярным и интерстициальным типом инфильтрата; острый флегмонозный и гангренозный аппендицит) носят однотипный характер.

3. Нарушения функциональных свойств нейтрофилов крови при остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* сопряжены с изменением состояния редокс-зависимых механизмов регуляции, опосредуемых участием тиолдисульфидной системы и окислительной модификацией белков, а также влиянием внутриклеточных сигнальных систем (циклических нуклеотидов и ионов кальция) на реализацию апоптотической программы.

4. Окислительный стресс, развивающийся как при остром воспалении, так и индуцированный *in vitro* (200 мкМ H₂O₂), сопровождается снижением редокс-статуса тиолдисульфидной системы нейтрофилов крови, что проявляется низким содержанием восстановленного глутатиона, тиоловых групп белков и активности глутатионпероксидазы на фоне высокой концентрации глутатиондисульфида и повышения глутатионилирования белков. В условиях блокады SH-групп в глутатионе и белках 5 мМ N-этилмалеимидом *in vitro* сохраняется

повышенное глутатионирование белков в нейтрофилах; при ингибировании синтеза глутатиона *de novo* 1 мМ бутионин-сульфоксимином клеточный пул глутатиона перераспределяется в пользу белковосвязанной формы.

5. При остром воспалении и окислительном стрессе *in vitro* (200 мкМ H_2O_2) в нейтрофилах крови возрастает карбонилирование белков, что сопровождается увеличением содержания карбонильных производных белков, битирозина и окисленного триптофана в плазме крови у пациентов с острым воспалением.

6. В защите белков нейтрофилов крови от окислительного повреждения участвует восстановленный глутатион: снижение его содержания в клетках при культивировании с ингибитором синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимином или ингибитором каталазы 2 мМ 3-амино-1,2,4-триазолом сопровождается увеличением содержания карбонилированных белков, а увеличение его содержания при культивировании клеток с протектором SH-групп 1,4-дителиоэритритолом приводит к снижению карбонилирования белков.

7. Блокада SH-групп белков и глутатиона N-этилмалеимидом в нейтрофилах крови у пациентов с острым воспалением и при индукции окислительного стресса *in vitro* (200 мкМ H_2O_2) сопровождается снижением активности миелопероксидазы, продукции гидроксильного радикала и цитокинов (IL-8 и TNF- α), а ингибирование синтеза глутатиона бутионин-сульфоксимином угнетает активность миелопероксидазы и продукцию гидроксильного радикала, не влияя на продукцию провоспалительных цитокинов. Влияние дефицита восстановленного глутатиона на кислород-зависимые механизмы функциональной активности нейтрофилов (продукция активных форм кислорода) при остром воспалении однотипно таковому в условиях экспериментального окислительного стресса.

8. При остром воспалении и экспериментальном окислительном стрессе (5 мМ H_2O_2) возрастает продукция метаболитов NO нейтрофилами крови. Оксид азота обладает ингибирующим эффектом в отношении развития апоптоза нейтрофилов, о чем свидетельствует ограничение развития программированной гибели клеток при культивировании с L-аргинином в условиях окислительного стресса *in vitro*.

9. Нарушения процесса программированной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе в эксперименте *in vitro* (5 мМ H_2O_2) не связаны с влиянием оксида азота на баланс про- (Bax) и антиапоптотических (Bcl-2) белков, а опосредованы внутриклеточными сигнальными молекулами – цГМФ (увеличение содержания), а также цАМФ и ионами кальция (снижение концентрации). Влияние оксида азота на реализацию апоптоза нейтрофилов при остром воспалении имеет однонаправленный характер с моделью окислительного стресса *in vitro* и сопряжено с увеличением содержания в клетке цГМФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Значение системы глутатиона для адаптивной компенсации функций эритроцитов при воспалении / О.Л. Носарева, Т.В. Жаворонок, В.Н. Бутусова и соавт. // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4, Приложение 1. – С. 140.
2. Нарушение физиологического баланса в системе прооксиданты-антиоксиданты при остром воспалении / Т.В. Жаворонок, О.Л. Носарева, В.Н. Бутусова, Ю.В. Стариков // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4, Приложение 1. – С. 174.
3. Проявления окислительного стресса в красных клетках крови при острых воспалительных заболеваниях / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Е.А. Степовая и соавт. // Сб.: «Научные труды I съезда физиологов СНГ». – М.: «Медицина-Здоровье», 2005. – Т. 2. – С. 155.
4. Особенности структурной организации и транспортных систем мембран эритроцитов при остром воспалении / Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «Научные труды I съезда физиологов СНГ». – М.: Медицина-Здоровье, 2005. – Т. 2. – С. 155-156.
5. Erythrocyte and blood plasma antioxidant system status during the community-acquired pneumonia acute period / T.V. Zhavoronok, T.S. Ageeva, E.A. Stepovaya et al. // European Respiratory Journal. – 2006. – Vol. 28, Sup. 50. – 1s.
6. Особенности детоксикации с участием ферментов микросомального окисления и глутатион-зависимых ферментов при псевдотуберкулезе у детей / Т.В. Жаворонок, О.Л. Носарева, А.П. Помогаева, В.Н. Бутусова, Ю.В. Стариков, Е.М. Климанова, Г.В. Петина, Е.А. Степовая // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2006. – № 1. – С. 18-22.
7. Система глутатиона при окислительном стрессе в дебюте внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Е.А. Степовая и соавт. // Сб.: «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований»: материалы научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 24.
8. Состояние нейтрофилов и окислительная модификация белков при внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Т.С. Агеева и соавт. // Сб.: «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований»: материалы научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 25.
9. Активность Na^+/K^+ -АТФазы, 5'-нуклеотидазы и особенности окислительной модификации липидов мембран эритроцитов в острый период внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, Г.В. Петина и соавт. // Сб.: «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований»: материалы научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2006. – С. 26.
10. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая, Е.Б. Кравец, В.В. Иванов, Т.В. Жаворонок, О.М. Чудакова, В.Н. Бутусова, Н.М. Яковлева // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2006. – № 2. – С. 62-69.
11. Механизмы антиперекисной защиты и система глутатиона при острой иерсиниозной инфекции / Т.В. Жаворонок, О.Л. Носарева, А.П. Помогаева, В.Н. Бутусова, Ю.В. Стариков, Е.А. Степовая // **Эпидемиология и инфекционные болезни**. – 2006. – №2. – С. 28-31.

12. Система антиоксидантной защиты при окислительном стрессе в дебюте внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Т.С. Агеева, Г.В. Петина и соавт. // Сб.: «XVI Национальный конгресс по болезням органов дыхания. II Конгресс Евроазиатского Респираторного Общества»: сборник трудов. – СПб, 2006. – С. 452.
13. Функциональная активность нейтрофилов и оценка окислительной модификации белков при внебольничной пневмонии в зависимости от характера легочного инфильтрата / Т.В. Жаворонок, Т.С. Агеева, Г.В. Петина и соавт. // Сб.: «XVI Национальный конгресс по болезням органов дыхания. II Конгресс Евроазиатского Респираторного Общества»: сборник трудов. – СПб, 2006. – С. 453.
14. Активность мембранозависимых ферментов и особенности окислительной модификации мембран эритроцитов в острый период внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Т.С. Агеева, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «XVI Национальный конгресс по болезням органов дыхания. II Конгресс Евроазиатского Респираторного Общества»: сборник трудов. – СПб, 2006. – С. 454.
15. Закономерности нарушения окислительного метаболизма при острых воспалительных заболеваниях / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Г.В. Петина, Е.Г. Соколович, Ю.В. Стариков, М.А. Дума, В.В. Иванов, О.М. Чудакова // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2006. – № 12. – С. 10-14.
16. Дезадаптивные изменения структурно-метаболических свойств нейтрофилов при пневмонии / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Е.А. Степовая и соавт. // Вестник Томского государственного университета. Приложение № 21. – 2006. – № 12. – С. 48-49.
17. Дополнительные возможности в диагностике внебольничной пневмонии / Ф.Ф. Тетенев, Т.С. Агеева, Т.В. Жаворонок, Н.Г. Кривоногов, А.В. Дубоделова, Г.В. Петина, Ю.В. Стариков, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая // **Сибирский медицинский журнал**. – 2007. – Т. 68, № 1. – С. 54-57.
18. The effect of NO synthesis modulators on calcium accumulation and neutrophil apoptosis during the community-acquired pneumonia / T.V. Zhavoronok, Yu.V. Starikov, T.S. Ageeva et al. // *European Respiratory Journal*. – 2007. – Vol. 30, Sup. 51. – No 3138.
19. Внебольничные пневмонии: клинико-сцинтиграфическая характеристика и окислительный дисбаланс клеток / Т.С. Агеева, Т.В. Жаворонок, Ф.Ф. Тетенев и соавт. // **Клиническая медицина**. – 2007. – №7. – С. 43-48.
20. Influence of oxidative stress on redox-state and peripheral blood heterophilic leucocytes apoptotic program realization / T.V. Zhavoronok, Ye.A. Stepovaya, N.V. Ryazanceva et al. // *Eur. Journal of Nat. History*. – 2007. – № 6. – P. 63-64.
21. Оценка процессов окислительной модификации белков нейтрофилов и эритроцитов в условиях окислительного стресса / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Г.В. Петина и соавт. // *Фундаментальные исследования*. – 2007. – № 12 (ч. 2). – С. 383-384.
22. Мембранозависимые ферменты и особенности структуры мембран эритроцитов при внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Т.С. Агеева, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «Актуальные вопросы медицинского обеспечения войск, подготовки и усовершенствования военно-медицинских кадров»: материалы научно-практической конференции профессорско-преподавательского состава ТВМедИ. – Томск, 2007. – Вып. 10. – С. 70-71.

- 23.** Окислительный метаболизм клеток в дебюте внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова»: тезисы докладов. – Москва, 2007. – С. 226-227.
- 24.** Механизмы реализации апоптотической программы нейтрофилов при ингибировании и активации синтеза NO в условиях окислительного стресса *in vitro* / Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине»: материалы международного междисциплинарного симпозиума. – Судак, Новосибирск, 2007. – С. 46-48.
- 25.** Оценка окислительной модификации белков и метаболический статус нейтрофилов при внебольничной пневмонии в зависимости от характера легочного инфильтрата / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Ю.В. Стариков и соавт. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 9. – С. 85.
- 26.** Участие системы глутатиона в редокс-регуляции нейтрофилов при внебольничной пневмонии и окислительном стрессе *in vitro* / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Ю.В. Стариков и соавт. // Вятский медицинский вестник, специальный выпуск. – 2007. – № 4. – С. 98-99.
- 27.** Окислительный метаболизм и апоптоз нейтрофильных лейкоцитов при внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Т.С. Агеева и соавт. // Сб.: «XVII национальный конгресс по болезням органов дыхания»: сборник трудов. – Казань, 2007. – С. 128.
- 28.** Тиол-дисульфидная составляющая редокс-регуляции нейтрофилов при внебольничной пневмонии / Т.В. Жаворонок, Г.В. Петина, Ю.В. Стариков и соавт. // Сб.: «Новый курс: консолидация усилий по охране здоровья нации»: материалы II национального конгресса терапевтов. – Москва, 2007. – С. 75-76.
- 29.** Дифференциально-диагностические признаки тромбоэмболии дистальных ветвей легочной артерии и внебольничной пневмонии / Т.С. Агеева, Н.Г. Кривоногов, Т.В. Жаворонок и соавт. // Сб.: «Актуальные вопросы кардиологии»: тезисы докладов 14 научно-практической конференции с международным участием. – Тюмень, 2007. – С. 5-6.
- 30.** Вклад глутатиона в редокс-регуляцию нейтрофильных гранулоцитов при окислительном стрессе *in vitro* / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «VI Сибирский физиологический съезд»: тезисы докладов. – Барнаул, 2008, Т. II. – С. 65-66.
- 31.** Community-acquired pneumonia acute period: neutrophil redox-potential and protein oxidative modification process / T.V. Zhavoronok, E.A. Stepovaya, N.V. Ryazanceva et al. // European Respiratory Journal. – 2008. – Vol. 32, Sup. 52. – N 1538.
- 32.** Участие тиолдисульфидной системы в редокс-регуляции нейтрофилов при окислительном стрессе *in vitro* и остром воспалении / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «Физиология и здоровье человека»: труды II съезда физиологов СНГ. – Кишинев, 2008. – С. 40.
- 33.** Система антиоксидантной защиты при окислительном стрессе в дебюте внебольничной пневмонии в зависимости от протяженности инфильтративного поражения легких / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева и соавт. // Сб.: «Новый курс: консолидация усилий по охране здоровья нации»: материалы III национального конгресса терапевтов. – Москва, 2008. – С. 84-85.

34. Функциональная активность нейтрофилов и оценка окислительной модификации белков при внебольничной пневмонии в зависимости от протяженности легочного инфильтрата / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Г.В. Петина и соавт. // Сб.: «XVIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания»: сборник трудов. – Екатеринбург, 2008. – С. 105-106.
35. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов / Е.А. Степовая, Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, В.А. Бычков, Н.Ю. Часовских, Е.Г. Старикова, Г.В. Петина, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2008. – Т. 146, № 12. - С. 646-650.
36. Antioxidant defence at the beginning of community-acquired pneumonia with lung infiltrative affection of different duration / T. Zhavoronok, E. Stepovaya, N. Ryazanceva et al. // *European Respiratory Journal*. – 2009. – Vol. 34, Sup. 53. – N 2923.
37. Функциональные свойства и окислительная модификация белков нейтрофилов и плазмы крови при внебольничной пневмонии / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок, Н.В. Рязанцева, В.В. Иванов, Т.С. Агеева, Ф.Ф. Тетенов // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2010. – № 3. – С. 18-21.
38. Роль тиолдисульфидной системы в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофилов при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок, Н.В. Рязанцева, В.В. Иванов, Т.С. Агеева, Ф.Ф. Тетенов, В.В. Новицкий // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2010. – № 8. – С. 161-165.
39. Жаворонок Т.В. Участие системы глутатиона в поддержании функционального состояния нейтрофилов при остром воспалении / Т.В. Жаворонок // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2010. – Т. 9, № 5. – С. 28-31.
40. Редокс-зависимое изменение продукции ИЛ-8, -10 и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов / Е.В. Кайгородова, Е.Г. Старикова, О.Е. Чечина, Н.Ю. Часовских, Т.В. Жаворонок, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // **Бюллетень СО РАМН**. – 2010. – Т. 30, №5. – С. 6-10.
41. Окислительный стресс в модуляции апоптоза нейтрофилов в патогенезе острых воспалительных заболеваний / Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева, Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, Т.С. Агеева, В.Я. Митасов, Е.Г. Соколович // **Бюллетень СО РАМН**. – 2010. – Т.30, №5. – С.58-63.
42. Участие тиолдисульфидной системы в регуляции окислительной модификации белков в нейтрофилах при окислительном стрессе / Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Т.В. Жаворонок, Н.В. Рязанцева, В.В. Иванов, Ф.Ф. Тетенов, Т.С. Агеева, В.В. Новицкий // **Бюллетень СО РАМН**. – 2010. – Т.30, №5 – С.64-69.
43. Роль индукции и ингибирования синтеза оксида азота в регуляции апоптоза нейтрофилов крови в условиях окислительного дисбаланса / Н.В.Рязанцева, Т.В. Жаворонок, Е.А.Степовая, Ю.В.Стариков, В.А.Бычков // **Биомедицинская химия**. – 2010. – Т. 56, вып 5. – С. 587-595.
44. Участие глутатиона в регуляции окислительной модификации внутриклеточных белков при окислительном стрессе / Т.В. Жаворонок, Е.А. Степовая, Г.В. Петина, Е.В. Шахристова // Сб.: «Биоантиоксидант: Тезисы докладов VIII международной конференции». – М.: РУДН, 2010. – С. 152-153.
45. Вклад глутатиона в поддержание функций нейтрофилов в условиях окислительного дисбаланса при остром воспалении / Т.В. Жаворонок, Е.А.

Степовая, Г.В. Петина // Сб.: «Биоантиоксидант: Тезисы докладов VIII международной конференции». – М.: РУДН, 2010. – С. 153-155.

46. Клинико-сцинтиграфическая характеристика и окислительные процессы в зависимости от распространенности инфильтративного поражения легочной ткани при внебольничных пневмониях / Т.С. Агеева, Т.В. Жаворонок, Ф.Ф. Тетенев, Н.Г. Кривоногов, Е.А. Степовая, Н.В. Рязанцева // **Терапевтический архив.** – 2011. – Т.83, №3. – С. 31-37.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода	ТДС – тиолдисульфидная система
Б-SH – сульфгидрильные группы белков	ЦП – церулоплазмин
Б-SSG – белково-связанный глутатион	АТ – 3-амино-1,2,4-триазол
ВП – внебольничная пневмония	BSO – бутионин-сульфоксимин
ГПО – глутатионпероксидаза	Вax – проапоптотический белок X, ассоциированный с Bcl-2
КПБ – карбонильные производные белков	Bcl-2 – антиапоптотический белок лейкемии В-клеток-2
МПО – миелопероксидаза	DTE – 1,4-дитиоэритритол
ОА – острый аппендицит	GSH – восстановленный глутатион
ОМБ – окислительная модификация белков	GSSG – окисленный глутатион
ОС – окислительный стресс	IL – интерлейкин
ОВ – острое воспаление	NEM – N-этилмалеимид
ОВЗ – острые воспалительные заболевания	NOs – синтаза оксида азота
ПОЛ – перекисное окисление липидов ТБК-	TNF α – фактор некроза опухоли α
РП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой	