

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ И РОЛЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Савченко^{1,2}, И.В. Кудрявцев^{3,4}, А.Г. Борисов^{1,2}

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В свете современных представлений респираторный взрыв, напрямую связанный с процессами фагоцитоза, характеризует функциональную активность фагоцитирующих клеток. В данном обзоре представлены современные методы оценки состояния респираторного взрыва фагоцитов, основанные на цитофлюориметрическом и хемилюминесцентном анализе. Подробно представлены последовательность и механизмы реакций синтеза активных форм кислорода (АФК) в процессе респираторного взрыва клеток. Охарактеризована последовательность синтеза от АФК с низкой бактерицидной активностью к АФК с высокой бактерицидной активностью. В обзоре подробно описаны наиболее популярные красители для цитофлюориметрического анализа для оценки уровней синтеза АФК. Приводятся характеристики и примеры применения таких красителей, как дигидроэтидин, дихлородигидрофлуоресцеин и дигидрородамин 123. Представлены основные этапы и механизмы хемилюминесцентной реакции. Описаны особенности применения основных индикаторов (люминол и люцигенин) хемилюминесцентной реакции. Приводится механизм оценки показателей хемилюминесцентной реакции, характеризующие особенности состояния и кинетики респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Отдельный раздел обзора посвящен роли респираторного взрыва фагоцитирующих клеток при различных иммунопатологических состояниях. Представлены данные литературы о патогенетическом значении изменения интенсивности и кинетики респираторного взрыва фагоцитов при инфекционных, воспалительных и онкологических заболеваниях. Приводятся примеры новых методов диагностики и прогноза характера течения иммунопатологических состояний на основе оценки респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Данные литературы показывают, что в настоящее время при диагностике и оценке характера течения заболеваний состояние респираторного взрыва определяется у различных типов клеток врожденного иммунитета: нейтрофилы, моноциты и т. д. Делается заключение о том, что оценка респираторного взрыва фагоцитирующих клеток позволяет охарактеризовать как фундаментальные механизмы реагирования клеток врожденного иммунитета на патогенные и регуляторные воздействия, так разрабатывать новые высокочувствительные методы диагностики и прогноза развития и исхода различных иммунопатологических состояний.

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

Igor V. Kudryavtsev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Библиографическое описание:

Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340

Citation:

Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340

тологических состояний. Представленные методы проточной цитометрии и хемилюминесцентного анализа позволяют определять как интегральное состояние респираторного взрыва, так и уровни и кинетические параметры синтеза отдельных АФК.

Ключевые слова: респираторный взрыв, фагоцитирующие клетки, нейтрофилы, моноциты, активные формы кислорода, супероксид-радикал, инфекционно-воспалительные заболевания.

METHODS OF ESTIMATION AND THE ROLE OF RESPIRATORY BURST IN THE PATHOGENESIS OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY DISEASES

Savchenko A.A.^{a,b}, Kudryavtsev I.V.^{c,d}, Borisov A.G.^{a,b}

^a Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. According to the modern concepts the respiratory burst directly related to the processes of phagocytosis characterizes the functional activity of phagocytic cells. This review presents modern methods for assessing the respiratory burst state of phagocytes based on cytofluorometric and chemiluminescent analysis. The sequence and mechanisms of the reactions of reactive oxygen species (ROS) synthesis in the process of respiratory cell burst are presented in detail. The sequence of synthesis from ROS with low bactericidal activity to ROS with high bactericidal activity is characterized. The review describes in detail the most popular dyes for cytofluorometric analysis to assess the levels of ROS synthesis. Characteristics and examples of the use of such dyes as dihydroethidine, dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are given. The main stages and mechanisms of the chemiluminescence reaction are presented. The features of the use of the main indicators (luminol and lucigenin) of the chemiluminescence reaction are described. A mechanism for estimating the parameters of the chemiluminescence reaction characterizing the features of the state and kinetics of the respiratory burst of phagocytic cells is given. The separate section of the review is devoted to the role of a respiratory burst in phagocytic cells in various immunopathological states. Data on the pathogenetic significance of changes in the intensity and kinetics of respiratory burst of phagocytes in infectious, inflammatory and oncological diseases were presented. Examples of new methods for diagnosing and predicting the course of the immunopathological states characters are presented on the basis of an assessment of the respiratory burst of phagocytic cells. The literature data show that at present, in the diagnosis and evaluation of the nature of the diseases characters the state of a respiratory burst is evaluated in various types of cells of innate immunity: neutrophils, monocytes, etc. It is concluded that the evaluation of the respiratory burst of phagocytic cells can be characterized as the fundamental mechanisms of reacting cells of innate immunity to pathogenic and regulatory effects, so to develop new highly sensitive methods for diagnosing and predicting the development and outcome of various immunopathological conditions. The presented methods of flow cytometry and chemiluminescence analysis make it possible to determine both the integral state of the respiratory explosion, and the levels and kinetic parameters of the synthesis of individual ROS.

Key words: respiratory burst, phagocytic cells, neutrophils, monocytes, active oxygen species, superoxide radical, infectious and inflammatory diseases.

Введение

Одним из древнейших механизмов иммунной защиты, возникшим на самых ранних этапах эволюции живых организмов, является фагоцитоз [21]. Впервые явление фагоцитоза (от греч. «phagos» — пожирающий и «cytos» — клетка) было открыто и изучено И.И. Мечниковым (1882). Он установил, что фагоцитоз — это врожденная реакция организма, проявляющаяся в способности клеток-фагоцитов захватывать, проникающие в тело животного, инородные частицы с последующим их перевариванием [35]. Фагоцитирующие клетки в организме человека и животных представлены двумя типами. Во-первых, это полиморфно-ядерные

лейкоциты, из которых нейтрофильные гранулоциты являются основными эффекторными клетками острого воспаления. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [10]. И, во-вторых, это клетки макрофагально-фагоцитарной системы, в которую, кроме моноцитов и макрофагов, в последнее время также включают незрелые дендритные клетки. В процессе фагоцитоза макрофагами из организма также удаляются стареющие и погибшие клетки [13].

Независимо от типа фагоцитирующих клеток процесс фагоцитоза обязательно сопровождается респираторным взрывом. Под ре-

спираторным взрывом (дыхательный взрыв, respiratory burst) в фагоцитирующих клетках понимается процесс повышения синтеза активных форм кислорода (АФК), который развивается в клетках при фагоцитозе и регуляторных воздействиях. При этом клетки начинают активно потреблять кислород. В понятие АФК, на сегодняшний день, включают широкий спектр реакционно-активных форм соединений кислорода (радикалы, анионы), связанных с первичным синтезом супероксид-радикала. Все АФК делятся на две основные группы первичные АФК и вторичные. К первичным АФК относятся такие молекулы, как супероксид-радикал ($O_2^{\bullet-}$) и монооксид азота (NO). Последний, как отмечено в работе Ю.А. Владимирова и Е.В. Проскурниной (2009), также может определяться как активная форма азота [2].

Первичные АФК, обладающие регуляторным и умеренным бактерицидным действием, синтезируются в клетках в процессе ферментативной реакции: супероксид-радикал в ферментативной системе НАДФН-оксидазы, монооксид азота — NO-оксидазой.

Образование первичных АФК активирует комплекс ферментов, которые синтезируют вторичные АФК. К ним, в частности, относятся перекись водорода (H_2O_2), синтезируемая супероксиддисмутазой из супероксид-радикала, хлорноватистая кислота (HOCl), синтезируемая миелопероксидазой из H_2O_2 [17]. Некоторые вторичные АФК образуются в процессе неферментативных реакций. Так, супероксид-радикал может вступать в реакцию с NO с образованием пероксинитрита ($OONO^-$), который способен окислять NH- и SH-группы белков [2]. Все вторичные АФК обладают выраженной бактерицидной активностью.

Синтез АФК связан не только с механизмами респираторного взрыва, но и с процессами окислительного стресса. Под окислительным стрессом (оксидативный стресс, oxidative stress) понимаются процессы повреждения клеток и биологических молекул в результате окисления, которое развивается при повышении количества прооксидантов и уменьшении содержания антиоксидантов [2]. Кроме того, АФК могут синтезироваться в клетках и вне клеток за счет различных физиологических и патофизиологических процессов. Доказано, что 95% всего потребляемого клеткой кислорода попадает в митохондрии и участвует в реакциях окислительного фосфорилирования [17]. К другим важным физиологическим процессам с участием АФК относятся: стимуляция митоза и апоптоза, участие в межклеточных коммуникациях, высвобождение свободной арахидоновой кислоты из мембраны с последующим синтезом иммуноактивных соединений и т. д.

[32]. Широко известным патофизиологическим процессом с участием АФК является перекисное окисление липидов, которое активируется при развитии широкого спектра заболеваний [2]. В ряде случаев АФК кислорода могут индуцировать канцерогенез [20].

Синтез АФК в процессе респираторного взрыва фагоцитирующих клеток

Способность к продукции активных форм кислорода является одним из универсальных свойств фагоцитов позвоночных и беспозвоночных животных. В ответ на антигенный стимул или регуляторный сигнал повышается интенсивность потребления кислорода фагоцитирующими клетками. Кислород необходим не только для процессов жизнедеятельности самих клеток (например, аэробное дыхание), но и является основой для синтеза АФК, необходимых для уничтожения фагоцитированных объектов [2, 17].

Ключевым событием образования АФК является сборка ферментативного комплекса НАДФН-оксидазы (NADPH-oxidase, NOX) [17]. Фермент представляет собой клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный комплекс, локализующийся преимущественно на цитоплазматической мембране и в некоторых органеллах. В организме человека и млекопитающих выделяют 7 типов NOX, различающихся по составу субъединиц, клеточной специфичности, регуляции и некоторым другим параметрам (NOX1–5, LNOX1 и LNOX2) [42]. Например, NOX1 локализуется в различных типах клеток (эндотелий, клетки гладкой мускулатуры, эпителий кишечника, остеокласты, нейроны, глиальные клетки и фибробласты), участвует в регуляции кровяного давления, в росте и миграции гладкомышечных клеток. NOX2 преимущественно экспрессируется в моноцитарных и миелоцитарных клетках, инициирует развитие респираторного взрыва. Основой НАДФН-оксидазы являются две мембранные единицы: p91phox и p22phox. Субъединица p91phox содержит участок связывания НАДФН и протетическую группу FAD в C-концевой (цитоплазматической) части. «Phox» в составе белков характеризует фагоцитарную роль фермента (phagocyte oxidase). В процессе активации НАДФН-оксидазы к мембранным субъединицам присоединяются цитоплазматические субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox) и малый G-белок Rac1. Процесс сборки начинается с белка p47phox, который предварительно должен быть фосфорилирован протеинкиназой С. Необходимым условием этого являются сигнала-

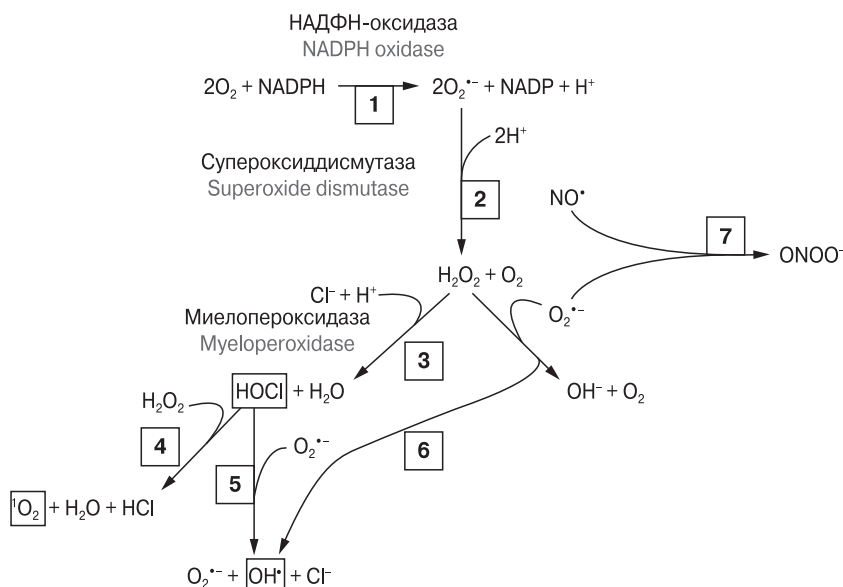


Рисунок 1. Механизм синтеза АФК фагоцитирующими клетками (по Beutler)

Figure 1. Mechanism of the ROS synthesis by phagocytic cells (according to Beutler)

Примечание: цифрами в рамках на рисунке обозначен номер реакции (пояснения в тексте).

Note: the numbers in the frame indicate the reaction number (explanation in the text).

лы от рецепторов фагоцитирующих клеток, отвечающих за распознавание патогена. Сборка ферментативного комплекса приводит к тому, что один из его компонентов, а именно gp91phox, приобретает конформацию, способную передавать электрон, полученный от цитоплазматического НАДФН, на молекулу кислорода O_2 (реакция 1 на рис. 1). В результате этой реакции образуется короткоживущий супероксид-радикал или супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$), сочетающий в себе свойства аниона и радикала. Сам по себе он относится к АФК с низкой бактерицидной активностью, но способен запускать последующую цепь реакций, приводящих к формированию токсичных для микроорганизмов активных форм кислорода. Также необходимо отметить, что НАДФН синтезируется в пентозофосфатном цикле, что определяет зависимость активности НАДФН-оксидазы от внутриклеточных метаболических процессов.

В ходе следующей реакции супероксид-радикал (реакция 2 на рис. 1) взаимодействует с протонами, в результате чего образуется перекись водорода (H_2O_2), обладающая выраженной антимикробной активностью. Эта реакция протекает в присутствии фермента супероксиддисмутаза (СОД). Перекись водорода способна вызывать окисление SH-групп у различных белков и вызвать перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. В организме человека и млекопитающих существует три типа СОД, различающихся по локализации, массе и виду переходного металла-кофактора в активном центре [18]. СОД1 локализуется в цитоплазма-

тическом компартменте, СОД2 — в митохондриях, СОД3 является внеклеточной формой. Атом Zn является структурным компонентом, тогда как атом Cu входит в состав активного центра СОД1 и СОД3. В составе активного центра СОД2 находится атом Mn. В составе активного центра СОД, выделяемых из бактерий, также обнаруживается атом Fe.

Образование перекиси водорода запускает каскад процессов, приводящих к формированию еще более токсичных форм кислорода. Так, в присутствии миелопероксидазы начинается формирование галогидных производных (реакция 3 на рис. 1). При наличии протонов и ионов хлора реакция протекает с образованием хлорноватистой (гипохлорной) кислоты (НОСl), обладающей высоким антимикробным эффектом. При взаимодействии хлорноватистой кислоты с аминокислотами происходит образование хлораминов, которые также обладают микробицидным действием.

НОСl может окисляться перекисью водорода (реакция 4 на рис. 1) с образованием синглетного кислорода ($\bullet O_2$), основной мишенью которого являются полиненасыщенные жирные кислоты. Результатом перекисного окисления последних является деструкция поверхностной мембраны микроорганизмов. С другой стороны, при взаимодействии с белками $\bullet O_2$ способен разрушать ковалентные связи между молекулами углерода. НОСl может взаимодействовать с $O_2^{\bullet-}$ (реакция 5 на рис. 1), в результате чего образуется гидроксильный радикал (OH^\bullet). Этот же радикал образуется и в ходе еще одной

реакции — спонтанной дисмутации (реакция 6 на рис. 1), которая протекает в присутствии ионов железа. В результате этой реакции происходит взаимодействие супероксид-радикала с перекисью водорода (реакция Фентона) [2]. Образовавшийся гидроксильный радикал считается одним из самых токсичных метаболитов кислорода. Под его действием происходит разрыв нитей ДНК и пептидных связей внутри белковых молекул, окисление сульфгидрильных групп и т. д.

Супероксид-радикал принимает участие еще в нескольких реакциях, например (реакция 7, рис. 1), в формировании пероксинитрита (OONO^-), окисляющего сульфгидрильные группы различных молекул. Кроме этого при взаимодействии супероксидрадикала с водой идет формирование озона (O_3), также обладающего широким антимикробным действием.

Методы оценки синтеза АФК с помощью проточной цитометрии

Проточная цитофлуориметрия — современная технология быстрого измерения характеристик клеток при помощи моноклональных антител или других зондов, позволяющая судить об их типе (по наличию того или иного набора клеточных маркеров) и функциональном состоянии (по изменению протекающих в них процессах). Принципиальным преимуществом проточной цитометрии по сравнению с другими общепринятыми и доступными лабораторными методами клеточного анализа является анализ индивидуальных параметров каждой клетки проанализированного образца. Анализ осуществляется в проточной ячейке прибора, где при помощи «гидродинамического фокусирования» частицы выстраиваются таким образом, чтобы проходить через зону анализа по очереди — одна за другой. Кроме того, современные приборы могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10^5 клеток в секунду, тогда как анализ большого количества клеток (до 10^7 клеток и более в одном образце) позволяет достигать высокой статистической достоверности получаемых результатов. Применение логических ограничений (введение в протокол исследования различных зон анализа для клеток или «гейтов» одновременно) допускает определение нескольких субпопуляций клеток в одном образце. Это особенно важно при характеристике гетерогенных клеточных популяций — например, лейкоциты периферической крови, среди которых можно выявить отдельно нейтрофилы и моноциты для оценки уровня продукции АФК каждой клеточной популяции (рис. 2).

Как уже отмечалось, процесс поглощения объекта фагоцитоза клеткой сопровождается образованием в фаголизосоме широкого спектра АФК, обладающих бактерицидным действием. Для исследования различных продуктов этих реакций широко применяются методы проточной цитофлуориметрии. В настоящее время использование специфических флуоресцентных красителей позволило изучить продукцию практически всех кислородных радикалов у фагоцитов. В таблице приведены некоторые из этих красителей. Несмотря на широкий спектр известных красителей, наиболее часто в иммунологических исследованиях применяются только три, а именно — дигидроэтидин, дихлородигидрофлуоресцеин и дигидрородамин 123. Все эти красители способны спонтанно диффундировать сквозь мембрану клеток и накапливаться в цитоплазме. Для эффективного возбуждения этих красителей применяются источники света с длиной волны около 488 нм, то есть самые распространенные и доступные большинству диагностических лабораторий. Для регистрации флуоресценции в случае дигидроэтидина используется фильтр с длиной волны пропускания около 610 нм (канал проточного цитометра, где идет регистрации фикоэритрина), тогда как в случае дихлородигидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123 регистрация сигнала осуществляется в диапазоне 510–520 нм, что соответствует каналу для регистрации ФИТЦ.

Гидроэтидин (дигидроэтидин). Дигидроэтидин применяется для исследования продукции супероксид-радикала. После спонтанного проникновения через мембрану фагоцитирующей клетки, обусловленного наличием липофильных свойств, дигидроэтидин взаимодействует с $\text{O}_2^{\bullet-}$ с образованием двух флуоресцирующих форм — этидиума (E^+) и 2-гидроксиэтидиума (2-OH-E^+). При этом показано, что формирование E^+ вызвано неспецифическими окислительно-восстановительными реакциями, которые не имеют прямого отношения к образованию супероксид-радикала [50]. В то же время 2-гидроксиэтидиум, спектральные характеристики которого весьма близки к таковым E^+ , накапливается в клетках только в присутствии супероксид-радикала. Оба образовавшихся в ходе окисления вещества способны при облучении источником света с длиной волны около 500 нм испускать флуоресценции в красной части спектра с максимумом в районе 610 нм. Однако интенсивность их флуоресценции значительно возрастает после накопления в митохондриях или после перемещения в ядро клетки, где они связываются с ДНК [16]. Особо следует подчеркнуть тот факт, что другие активные формы кислорода — например, ONOO^- , OH^\bullet и H_2O_2 —

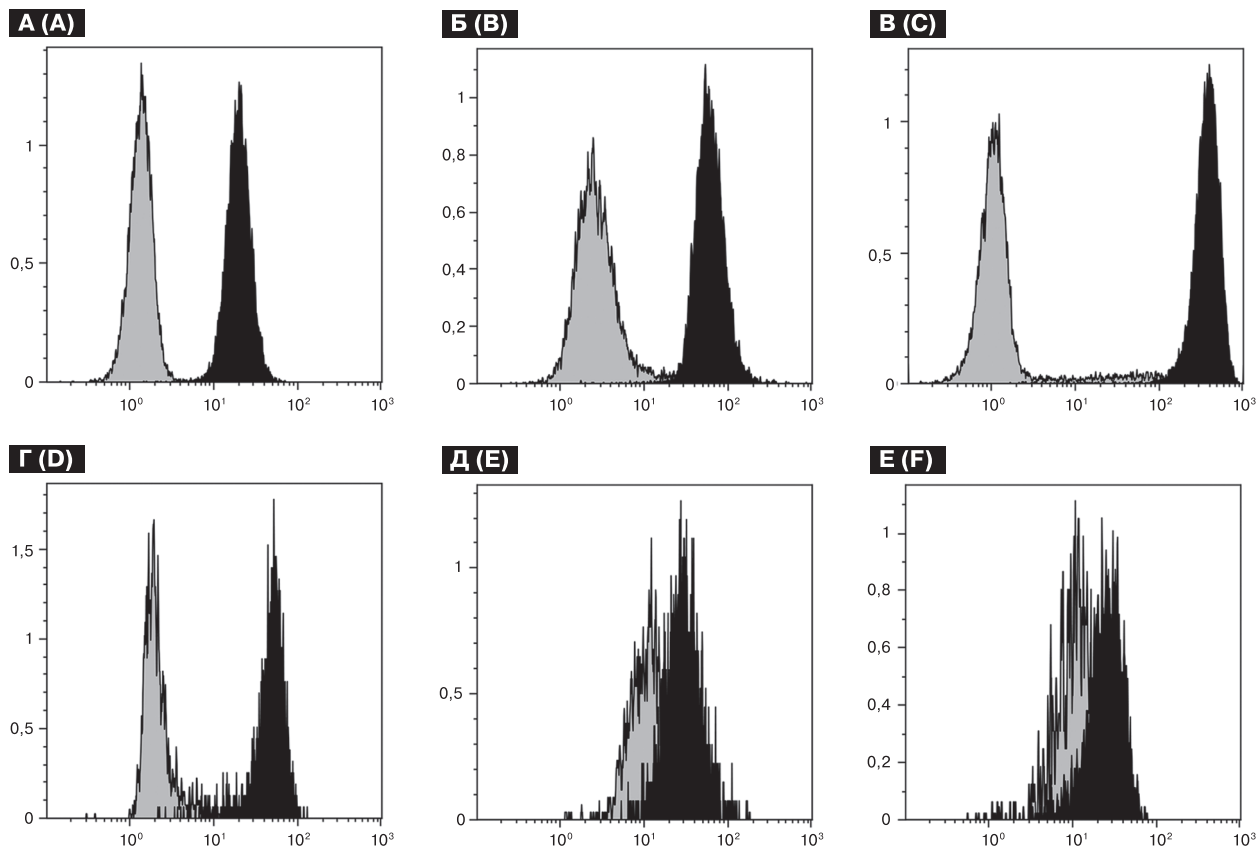


Рисунок 2. Продукция активных форм кислорода нейтрофилами (гистограмма А–В) и моноцитами (Г–Е) периферической крови

Figure 2. Reactive oxygen species production by peripheral blood neutrophils (histogram A–C) and monocytes (D–F)

По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции дигидроэтидина (А и Г), 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина (Б и Д) и дигидрородамина 123 (В и Е) соответственно; по оси ординат — количество проанализированных клеток.

Серым цветом представлена спонтанная продукция АФК, черным — продукция АФК после 15 мин инкубации клеток периферической крови в присутствии 50 нг/мл форболового эфира. Нейтрофилы выделены на основании экспрессии CD16, моноциты — на основании экспрессии CD14.

X-axis — the fluorescence intensity of dihydroethidine (A and G), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (B and D) and dihydrorhodamine 123 (B and E), respectively; the y-axis — the number of cells. Gray — spontaneous ROS production, black — peripheral blood cells were incubated in the presence of 50 ng/ml of for 15 min PMA. Neutrophils were isolated based on CD16 expression, while monocytes were isolated based on CD14 expression.

Таблица. Флуоресцентные красители, применяемые для исследования продукции активных форм кислорода при помощи проточной цитофлуориметрии

Table. Fluorescent dyes widely used by flow cytometry to study the reactive oxygen species production

Краситель Fluorescent dye	Ex/Em, нм Ex/Em, nm	Лиганд Ligand
Гидроэтидин (дигидроэтидин)/Hydroethidine (dihydroethidine)	520/610	$O_2^{\bullet-}$
H ₂ DCFH, 2',7'-дигидродихлорфлуоресцеина диацетат/ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	498/522	H ₂ O ₂ , OH [•] , ROO [•]
Amplex Red	360/460	H ₂ O ₂
DHR, дигидрородамин 123/dihydrorhodamine 123	505/529	H ₂ O ₂ , HOCl, ONOO ⁻
DMA, 9,10-диметилантрацен/9,10-dimethylanthracene	375/436	1O_2
CHD, 1,3-циклогександион/1,3-cyclohexanedione	400/452	OH [•]
APF, аминофенилфлуоресцеин/aminophenyl fluorescein	500/520	HOCl, HO [•]
DPBF, 1,3-дифенилизобензофуран/1,3-diphenylisobenzofuran	410/455	$O_2^{\bullet-}$, 1O_2
β-фикоэритрин/β-phycoerythrin	520/580	ROO [•]

способны окислять дигидроэтидин именно до E^+ , что не позволяет рассматривать данный краситель в качестве специфического для определения уровня продукции $O_2^{\bullet-}$ фагоцитирующими клетками. Вместе с тем использование дигидроэтидина позволяет судить о способности клеток к формированию активных форм кислорода в целом, что не снижает его клинической значимости при диагностике и прогнозе характера течения широкого спектра заболеваний, связанных с нарушениями фагоцитарного звена врожденного иммунитета [33]. На модели экспериментальных животных на основе реакции дигидроэтидина разработан протокол определения активности миелопероксидазы *in vivo* и *ex vivo* в артериях для оценки воспалительных процессов и заболеваний сосудов [43].

Ограничения, связанные с неспецифическим формированием флуоресцирующих форм дигидроэтидина, распространяются и на его два основных аналога — гидропропидин и MitoSOX™ Red. Гидропропидин является водорастворимым аналогом дигидроэтидина, лишенным липофильных свойств, благодаря наличию сильного положительного заряда у молекулы [31]. Данная особенность строения молекулы предотвращает ее поглощение клетками, что позволяет использовать этот флуоресцентный зонд для измерения внеклеточного супероксид-радикала при помощи флуориметрии, а не проточной цитометрии. Краситель MitoSOX™ Red применяется для оценки уровня супероксид-радикала в митохондриях клеток при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии [38].

Альтернативой дигидроэтидина могут служить высокоспецифические красители, флуоресценция которых не зависит от окислительно-восстановительных реакций. Например, соединения типа бис-(2,4-динитробензолсульфонил) флуоресцеинов [34].

H_2DCFH (2,7-дихлородигидрофлуоресцеин). 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин получил широкое распространение в иммунологических и цитологических исследованиях благодаря тому, что в форме диацетата (DCFH-DA) он способен спонтанно проникать через мембрану клеток [15]. После прохождения мембраны под действием неспецифических эстераз, локализованных в цитоплазме клеток, он превращается в нефлуоресцирующее соединение — дихлородигидрофлуоресцеин (DCFH). В присутствии пероксидазы происходит окисление DCFH за счет H_2O_2 , после чего DCFH переходит в форму дихлорофлуоресцеина (DCF), обладающего выраженной флуоресценцией в зеленой части спектра. Именно эта форма красителя и регистрируется в клетках при проведении анализа с помощью методов проточ-

ной цитофлуориметрии. Например, Wang Y. et al. (2017) на основе анализа с DCFH-DA охарактеризовали состояние респираторного взрыва макрофагов при формировании атеросклеротической бляшки [47].

Несмотря на широкое применение данного красителя в иммунологических исследованиях и в клеточной биологии в целом, DCFH-DA не может служить надежным индикатором для определения внутриклеточной H_2O_2 и других АФК по целому ряду причин. Во-первых, этот краситель непосредственно с H_2O_2 не реагирует с формированием флуоресцентного соединения, используемого для регистрации флуоресценции при помощи цитометрии. Во-вторых, помимо перекиси водорода в цитоплазме клеток окисление DCFH может происходить и под действием гидроксильных (HO^{\bullet}), пероксильных (ROO^{\bullet}) радикалов и некоторых других. Также существенным ограничением является и тот факт, что промежуточная форма красителя DCFH — $DCF^{\bullet-}$ — способна самостоятельно реагировать с кислородом с образованием супероксид-радикала, который, в свою очередь, в ходе дисмутации формирует внутриклеточную перекись водорода. Последнее событие приводит в более эффективному окислению DCFH во флуоресцирующую форму и сопровождается «искусственной» амплификацией флуоресцентного сигнала, регистрируемого при анализе клеток [24]. И, наконец, редокс-активные ионы металлов (например, Fe^{2+}), входящие в состав активных центров широкого спектра внутриклеточных ферментов, способны катализировать окисление DCFH, что тоже выражается в усилении флуоресценции клеток. Эти обстоятельства накладывают существенные ограничения на применение DCFH-DA как высокоспецифического флуоресцентного красителя для оценки уровня продукции АФК клетками, однако не снижают его популярности как показателя для оценки различных окислительно-восстановительных процессов, протекающих в живых системах [30, 48].

Дигидрорадамин 123 (DHR123). Как и дихлородигидрофлуоресцеин, дигидрорадамин 123, обладающий липофильными свойствами, способен спонтанно диффундировать через большинство клеточных мембран в виде нефлуоресцирующего соединения. Уже в цитоплазме под действием окислителя, в качестве которого выступает перекись водорода (а также в присутствии пероксидазы, цитохрома С или двухвалентного железа), краситель превращается в родамин 123, флуоресцирующий в зеленой части спектра с максимумом около 529 нм. Так как родамин 123 обладает катионными свойствами, то обычно он накапливается в составе митохондрий.

Окисление дигидрородамина может происходить под действием HOCl и пероскиннитрита ONOO^- , формирующегося в ходе реакции оксида азота и супероксид-радикала, образовавшихся в результате быстрого и спонтанного распада пероксиннитрита. Таким образом, данный краситель окисляется ONOO^- опосредованно и не может рассматриваться в качестве специфического маркера для его регистрации в клетках. Более того, промежуточный радикал дигидрородамин — DHR^{\bullet} — способен реагировать с молекулами кислорода, что сопровождается искусственной амплификацией флуоресценции клеток за счет действия молекул красителя, накопившихся в клетке [49]. Несмотря на столь низкую специфичность в выявление конкретных АФК в клетках, дигидрородамин широко применяется в иммунологических исследованиях. Более того, именно этот флуоресцентный краситель является «золотым стандартом» в диагностике такого первичного иммунодефицитного состояния как хроническая гранулематозная болезнь [45].

В работе Navixbeck J.J. et al. (2015) продемонстрирован многопараметрический подход, основанный на платформе для визуализации проточной цитометрии для изучения антимикробных реакций фагоцитов против грамотрицательных бактерий *Aeromonas veronii* [27]. Известно, что этот возбудитель вызывает выраженные воспалительные реакции у различных видов животных, включая людей. Установлено, что интенсивность фагоцитоза *A. veronii* в исследуемом промежутке времени находилась в прямой зависимости от активности респираторного взрыва. Вместе с тем с помощью проточной цитометрии выделены фракции макрофагов, в которых связывание и фагоцитоз *A. veronii* не коррелировал с уровнем синтеза АФК. Авторы отмечают, что представленный ими многопараметрический подход, основанный на проточной цитометрии на основе анализа изображений, позволяет провести сегрегацию уникальных популяций фагоцитов и изучить их последующие антимикробные реакции.

Хемилюминесцентный анализ респираторного взрыва фагоцитирующих клеток

Другим методом оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток является хемилюминесцентный анализ. Под люминесценцией понимается широкий ряд реакций, в которых возбужденные молекулы переходят в основное состояние с испусканием кванта света [2, 10]. Люминесценция химических реакций называется хемилюминесценцией.

Хемилюминесценция довольно часто возникает в реакциях окисления или при рекомбинации радикалов. Для ее возникновения прежде всего необходимо, чтобы общая выделяемая энергия была больше 70 ккал/моль (это соответствует диапазону энергий видимой области спектра 400–700 нм). В этих условиях может образоваться электронно-возбужденный продукт, возвращение которого в основное состояние сопровождается излучением видимого света. Свечение это довольно слабое, поскольку квантовый выход электронно-возбужденного продукта невысок (0,001–0,1). При этом под квантовым выходом хемилюминесценции понимается число испущенных квантов на один акт реакции [2].

Выделяют 3 главных этапа хемилюминесцентной реакции [2, 10, 14]. Первым является подготовительный этап, в рамках которого осуществляется превращение исходных реагентов. С точки зрения механизма респираторного взрыва на этом этапе осуществляется синтез АФК. Второй этап определяется как ключевой, в рамках которого образуются продукты химической реакции (то есть взаимодействие ионов и радикалов) — часть из них находится электронно-возбужденном состоянии. И на третьем этапе осуществляется испускание кванта света, а также различные процессы безызлучательной дезактивации эмиттера хемилюминесценции и, соответственно, переход электронно-возбужденной молекулы в «спокойное» состояние. Данный этап характеризуется такими показателями, как время жизни эмиттера и квантовый выход люминесценции. В связи с тем, что образовавшиеся на ключевой стадии электронно-возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света, квантовый выход люминесценции многих возбужденных продуктов бывает низким. Для усиления интенсивности хемилюминесцентной реакции используют метод сенсibilизации излучения. Для этого в хемилюминесцентную пробу добавляют специальный акцептор излучения (индикатор, активатор, вторичный эмиттер), на который осуществляется безызлучательный перенос энергии электронно-возбужденной молекулы с последующим испусканием кванта света. Квантовый выход подобных хемилюминесцентных реакций значительно увеличивается. В зависимости от присутствия в реакционной смеси индикаторов или их отсутствия хемилюминесцентная реакция определяется, соответственно, как активированная (зависимая от индикатора) или неактивированная [14]. Обязательным требованием к подобным индикаторам хемилюминесцентной реакции является отсутствие какого-либо воздействия на биологические объекты.

В качестве основных индикаторов, которые на сегодняшний день используются в хемилюминесцентном анализе оценки состояния респираторного взрыва выступают люминол и люцигенин [2, 10]. Люминол ($C_8H_7N_3O_2$) представляет собой белые или светло-желтые кристаллы, хорошо растворимые в полярных органических растворителях и практически не растворимые в воде. Люминол взаимодействует со всеми формами АФК. Это, безусловно, определяет невозможность его использования для оценки уровня синтеза конкретной АФК, но, с другой стороны, позволяет интегрально охарактеризовать состояние респираторного взрыва фагоцитирующих клеток.

Кроме люминола, в качестве хемилюминесцентного индикатора также широко используется люцигенин (N,N-диметилбиакридилнитрат). Представляет собой золотисто-желтые кристаллы хорошо растворимые в воде. Наиболее чувствителен к супероксид-радикалу. В связи с этим, люцигенин-зависимая хемилюминесценция преимущественно используется для оценки уровня синтеза данной первичной АФК [2, 10].

Также для оценки состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток используются и другие хемилюминесцентные индикаторы. Так, аналогом люминола является индикатор L-012 (8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4-(2H,3H)дион). Считается, что интенсивность хемилюминесценции при использовании L-012 в 100 раз выше, чем в люминол-зависимой хемилюминесценции [2, 51]. Кроме того, разработаны молекулы еще более усиливающие хемилюминесцентную активность L-012. Так, в работе Ichibangase T. et al. (2014) сообщается, что чувствительность определения H_2O_2 в хемилюминесцентной реакции L-012 в комплексе с 2-(4-гидроксибензил)-4,5-ди(2-пиридил)имидазолом и 4-йодфенолом составила 0,29 и 1,5 пмоль соответственно [29].

Разработан хемилюминесцентный индикатор 2-метил-6-[p-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-a]пиразин-3-он (MCLA), который является чувствительным к синглетному кислороду и супероксид-радикалу [46]. В работе Hosaka S. et al. (2005) продемонстрирован метод оценки эффективности антиоксидантов по их снижению интенсивности MCLA-зависимой хемилюминесценции [28].

Таким образом, в запасе исследователей респираторного взрыва фагоцитирующих клеток имеется широкий спектр хемилюминесцентных индикаторов, позволяющих с высокой степенью чувствительности оценивать как интегральное состояние респираторного взрыва (весь синтезируемый клетками комплекс АФК), так и отдельные АФК.

Кинетика хемилюминесцентной реакции при оценке респираторного взрыва нейтрофилов крови у здоровых людей на примере люминола представлена на рисунке 3, где отображены спонтанная хемилюминесценция (1) и зимозан-индуцированная (2) нейтрофильных гранулоцитов. Наличие четко выраженной кинетики спонтанной хемилюминесценции связано с действием комплекса различных регуляторных факторов на клетки (например, изменение состава среды, температуры и т. д.). Опсонизированный зимозан является наиболее распространенным индуктором дыхательного взрыва фагоцитирующих клеток [10]. Зимозан представляет собой полисахарид, содержащийся в стенках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме индукции респираторного взрыва фагоцитов, зимозан также способен активировать комплемент в присутствии пропердина по альтернативному пути. Опсонизированный зимозан индуцирует более интенсивный респираторный взрыв фагоцитирующих клеток, чем исходный.

Характеристику состояния респираторного взрыва осуществляют по следующим показателям, регистрируемым отдельно для спонтанной и индуцированной хемилюминесценции: время выхода на максимум (3), максимум интенсивности хемилюминесценции (4), площадь под кривой хемилюминесценции и индекс активации

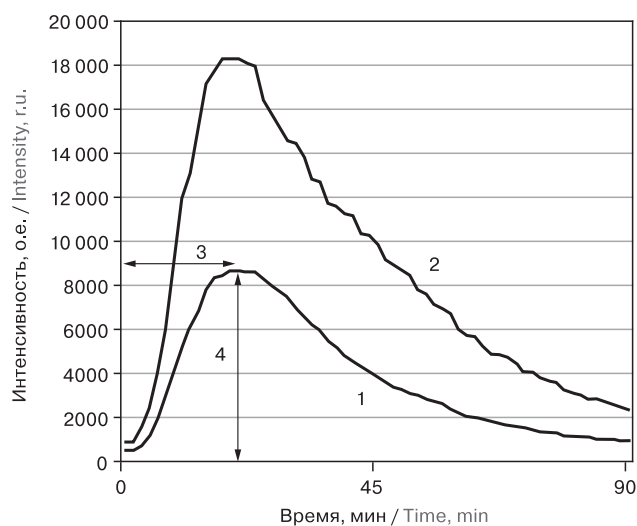


Рисунок 3. Кинетика спонтанной (1) и зимозан-индуцированной (2) хемилюминесценции нейтрофилов крови здоровых людей

Figure 3. Kinetics of spontaneous (1) and zymosan-induced (2) chemiluminescence of blood neutrophils in healthy people

Примечание: цифрами на рисунке обозначены: 3 — время выхода на максимум хемилюминесценции; 4 — максимум хемилюминесценции.

Note: the digits in figure is indicated: 3 — time to peak chemiluminescence; 4 — maximum of chemiluminescence.

ции. Время выхода на максимум характеризует длительность развития максимальной активности синтеза АФК от момента антигенной или регуляторной индукции респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Этот период, прежде всего, зависит от состояния внешней цитоплазматической мембраны и метаболизма клеток [10]. При острых инфекционно-воспалительных заболеваниях, когда нейтрофилы находятся в активированном состоянии, время выхода на максимум хемилюминесценции сокращается [11]. В то же время при хронических воспалительных процессах, на фоне снижения активности основных метаболических процессов в фагоцитах, время выхода на максимум хемилюминесцентной активности увеличивается. Максимум интенсивности хемилюминесценции определяет максимальную активность синтеза АФК клеткой. Площадь под кривой хемилюминесценции интегрально характеризует весь комплекс АФК, вырабатываемых фагоцитами за исследуемый период. Максимум интенсивности и площадь под кривой также зависят от функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. Индекс активации вычисляется через отношение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции к площади под кривой спонтанной хемилюминесценции и характеризует наличие внутриклеточных метаболических резервов для реализации респираторного взрыва.

В целом, можно заключить, что хемилюминесцентный анализ является высокочувствительным и дает возможность получения бесконтактной информации о состоянии респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Кроме того, на основе хемилюминесцентного анализа также имеется возможность оценки влияния различных регуляторных факторов и патогенов на функцию фагоцитов.

Роль респираторного взрыва фагоцитирующих клеток при различных иммунопатогенетических состояниях

Изменение состояния респираторного взрыва фагоцитирующих клеток выявляется при многих иммунопатологических состояниях. Наиболее выраженные изменения в синтезе АФК фагоцитами обнаружены при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Так, О.В. Бердюгина и А.В. Ершова (2016) с помощью методов проточной цитометрии установили, что при фиброзно-кавернозной форме туберкулеза у больных в периферической крови снижается процент моноцитов способных к синтезу супероксид-радикала [1]. Причем снижение количества данной фракции моно-

цитов осуществлялось синхронно понижению поглотительной способности клеток. В работе Scharn C.R. et al. (2016) показано, что макрофаги легких слабее синтезировали первичные АФК (супероксид-радикал и монооксид азота) при туберкулезе [40]. Saengmuang P. et al. (2014) обнаружили снижение интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов и фагоцитоза при инфицировании клеток внутриклеточной патогенной бактерией *Burkholderia pseudomallei* [39]. Наиболее выраженные нарушения функциональной активности фагоцитов выявлены у пожилых людей и лиц с нарушенным гликемическим обменом.

Вирусные инфекции также влияют на состояние респираторного взрыва фагоцитов. Установлено, что воздействие на трансмембранный рецептор вируса герпеса (HVEM), который экспрессируется на нейтрофильных гранулоцитах, вызывает активацию эффекторных функций клеток данной популяции, включая респираторный взрыв, дегрануляцию, секрецию IL-8 и фагоцитоз [26]. Такой эффект определяется тем, что HVEM входит в состав семейства рецепторов фактора некроза опухоли. Развитие респираторного взрыва нейтрофилов крови в ответ на вирусную инфекцию зависит от их степени зрелости и фенотипа. В работе Pliyev B.K. et al. (2012) показано, что на фоне гриппозной инфекции в крови повышалось количество нейтрофилов с фенотипом CD35-CD49d⁺, которые были охарактеризованы как клетки с уменьшенной зернистостью и признаками метамиелоцитов [36]. При этом у CD35-CD49d⁺-нейтрофилов также выявлялся более низкий уровень респираторного взрыва и фагоцитоза. Tripathi S. et al. (2015) представлено исследование стимулирующей активности кателицидина LL-37 (cathelicidin LL-37, лизосомальный белок макрофагов и нейтрофилов) на состояние респираторного взрыва нейтрофилов на фоне инфекции вирусом гриппа [44]. Установлено, что кателицидин LL-37 стимулирует респираторный взрыв полиморфноядерных гранулоцитов посредством взаимодействия через формилпептидный рецептор 2 (FPR-2).

Как отмечалось выше, хемилюминесцентный анализ позволяет оценивать и регуляторные особенности респираторного взрыва фагоцитирующих клеток. Так, на основе хемилюминесцентного анализа респираторного взрыва нейтрофилов крови разработан метод оценки клеточной чувствительности к IFN α 2 [5]. В работе Л.М. Куртасовой с соавт. (2016) показано, что у детей с инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, в острый период заболевания отмечается уменьшение диапазона клеточной чувствительности лейкоцитов крови к IFN α 2 и наблюдается зависимость клеточной чув-

ствительности от дозы препарата и тяжести заболевания [4]. Полученные данные, по мнению авторов, свидетельствуют о необходимости индивидуального подхода к интерферонотерапии у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр.

Выраженные изменения синтеза АФК фагоцитирующими клетками обнаружены при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Обнаружено, что у больных распространенным гнойным перитонитом состояние респираторного взрыва нейтрофилов характеризуется повышением уровня синтеза как первичных, так и вторичных АФК [11]. Повышается скорость активации НАДФН-оксидазы, что, однако, может привести к быстрому метаболическому истощению нейтрофилов. Установлена информативность показателей респираторного взрыва нейтрофилов в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) [6]. У больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода развивается абдоминальный сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных АФК и повышенным уровнем спонтанного синтеза вторичных АФК. Уровни синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами при индукции респираторного взрыва опсонизированным зимозаном незначительно различаются в группах больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса в послеоперационном периоде [7]. Авторами выявлена зависимость хемилюминесцентных показателей нейтрофилов от содержания TNF α и IL-6 в крови.

В работе Sikora J.P. et al. (2008) представлены результаты исследования особенностей синтеза АФК нейтрофилами у детей с ожоговой болезнью на фоне развития системного воспалительного ответа [41]. Продемонстрирована зависимость состояния респираторного взрыва нейтрофилов от концентрации некоторых цитокинов в крови. Установлено, что при развитии системного воспалительного ответа у детей с ожоговой болезнью интенсивность кислородного метаболизма фагоцитирующих клеток снижается. Авторы отмечают наличие клинической значимости показателей цитометрического анализа на основе BURSTTEST в прогнозе характера течения системного воспалительного ответа.

В работе О.В. Смирновой с соавт. (2016) показано, что у больных механической желтухой (МЖ), вызванной желчекаменной болезнью, интенсивность спонтанной и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов была снижена по сравнению с контрольными значениями [12]. При МЖ

злокачественного генеза обнаружено повышение интенсивности зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Также при МЖ обнаружена зависимость между интенсивностью хемилюминесценции нейтрофилов и уровнем билирубина в крови.

В настоящее время интенсивно исследуется роль различных типов фагоцитирующих клеток в онкогенезе. Большой интерес вызывают исследования функции нейтрофилов и моноцитов крови, что связано с их ролью в регуляции иммунных реакций и в реализации воспалительных процессов при опухолевом росте [3, 9]. Актуальность изучения физиологии и функции дендритных клеток определяется необходимостью расшифровки фундаментальных механизмов инициации адаптивного иммунитета и практической значимостью при разработке клеточных технологий иммунотерапии [19]. Ряд исследований посвящено неоднозначной роли макрофагов в опухоли [22, 37]. Не меньший интерес вызывают исследования роли нейтрофилов в онкогенезе. Это связано, с тем, что нейтрофилы, являясь высокорепликативными клетками, реагируют практически на любые изменения внутренней среды организма, в том числе и на опухолевый рост [8, 13]. Доказано цитотоксическое действие нейтрофильных гранулоцитов на раковые клетки. Кроме того, обнаружено, что если на ранних стадиях развития опухоли нейтрофилы реализуют противоопухолевую стратегию, то на поздних стадиях онкогенеза выявляется проопухолевая активность нейтрофилов [25].

С помощью хемилюминесцентного анализа обнаружено, что у больных раком почки наблюдается повышенный уровень респираторного взрыва нейтрофилов крови, который определяется синтезом как первичных, так и вторичных АФК [8]. При этом обнаружены взаимосвязи между уровнем синтеза АФК и фенотипическим составом нейтрофилов. Так, если у здоровых людей интенсивность респираторного взрыва была положительно взаимосвязана с количеством CD11b⁺-, CD62L⁺- и CD64⁺-нейтрофилов, то при онкологическом заболевании данные корреляции были потеряны.

В работе Л.М. Куртасовой с соавт. (2016) установлены особенности изменения состояния респираторного взрыва нейтрофилов у больных раком почки и мочевого пузыря в динамике заболевания [3]. Обнаруженные изменения зависят от локализации опухолевого процесса. У больных раком почки изменения преимущественно затрагивают продукцию первичных АФК, у больных раком мочевого пузыря — начальные стадии окислительного метаболизма и вторичные АФК. Обнаружено, что восстановление компенсаторных метаболи-

ческих возможностей нейтрофилов крови в послеоперационном периоде быстрее происходит у больных раком мочевого пузыря. При исследовании активности респираторного взрыва и фенотипа моноцитов крови у больных раком почки обнаружено, что интенсивность синтеза АФК снижена [9]. При этом установлены особенности в распределении интенсивности респираторного взрыва по субпопуляциям моноцитов: снижается активность респираторного взрыва в моноцитах с фенотипом CD14⁺CD16⁻, но повышается в моноцитах с фенотипом CD14⁺CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺.

Таким образом, оценка респираторного взрыва фагоцитирующих клеток позволяет охарактеризовать фундаментальные механизмы реагирования клеток врожденного иммунитета на патогенные и регуляторные воздействия, а также разрабатывать новые высокочувствительные методы диагностики и прогноза развития и исхода различных иммунопатологических состояний. Представленные методы проточной цитометрии и хемилюминесцентного анализа позволяют определять как интегральное состояние респираторного взрыва, так и уровни и кинетические параметры синтеза отдельных АФК.

Список литературы/References

1. Бердюгина О.В., Ершова А.В. Функционально-метаболические особенности фагоцитов крови при разных формах туберкулезного воспалительного процесса легких // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 21–32. [Berdyugina O.V., Ershova A.V. Functional-metabolic features of blood phagocytes in different forms of tuberculous inflammatory process of the lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 21–32. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-21-32 (In Russ.)]
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341–388. [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoi khimii = Advances in Biochemistry*, 2009, vol. 49, pp. 341–388. (In Russ.)]
3. Куртасова Л.М., Зуков Р.А., Семенов Э.В. Особенности хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных в динамике заболевания // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 589–594. [Kurtasova L.M., Zukov R.A., Semenov E.V. Features of chemiluminescence of peripheral blood neutrophils in oncurologic patients in the course of the disease dynamics. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 589–594. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-589-594 (In Russ.)]
4. Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р. Клеточная чувствительность к интерферону-α2 in vitro у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна–Барр // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 1. С. 79–84. [Kurtasova L.M., Shakina N.A., Schmidt A.R. In vitro cellular response to interferon-α2 in children with infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-79-84 (In Russ.)]
5. Патент 2293988 Российская Федерация. Способ оценки чувствительности к интерферону у больных раком почки / Куртасова Л.М., Шкапова Е.А., Савченко А.А., Крыжановский А.И., Зуков Р.А., Рачкова Н.В. Заявители и патентообладатели: ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАН, Красноярский краевой онкологический диспансер; заявл. 10.09.2005; опубл. 20.02.2007 [Patent 2293988 Russian Federation. Method for assessing sensitivity to interferon in patients with kidney cancer / Kurtasova L.M., Shkapova E.A., Savchenko A.A., Kryzhanovskii A.I., Zukov R.A., Rachkova N.V. Applicants and patent holders: State Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk Regional Oncology Center; stat. 10.09.2005; publ. 20.02.2007]
6. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 475–482. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Gvozdev I.I. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 5, pp. 475–482. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482 (In Russ.)]
7. Патент 2620560 Российская Федерация. Способ прогнозирования развития абдоминального сепсиса у больных с распространенным гнойным перитонитом / Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Заявители и патентообладатели: ФИЦ КНЦ СО РАН; заявл. 10.11.2015; опубл. 26.05.2017 [Patent 2620560 Russian Federation. A method for predicting the development of abdominal sepsis in patients with advanced purulent peritonitis / Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Gvozdev I.I. Applicants and patent holders: FIC KNTS SO RAN; stat. 10.11.2015; publ. 26.05.2017]
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Гвоздев И.И., Тоначева О.Г. Особенности взаимосвязи фенотипа и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных раком почки // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 259–268. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Gvozdev I.I., Tonacheva O.G. Phenotypic features and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in the patients with renal cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 259–268. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-259-268 (In Russ.)]
9. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 141–150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150 (In Russ.)]

10. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitoveckiy D.E., Borisov A.G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk: Nauka, 2013. 142 p.]
11. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 1–2. С. 115–119. [Savchenko A.A., Zdzitoveckiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2, pp. 115–119. (In Russ.)]
12. Смирнова О.В., Титова Н.М., Каспаров Э.В., Елманова Н.Г. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов в прогрессировании механической желтухи в зависимости от уровня билирубина и генеза желтухи // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 3. С. 269–278. [Smirnova O.V., Titova N.M., Kasparov E.W., Yelmanova N.G. Chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in progression of obstructive jaundice depending on its origin and bilirubin levels. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 269–278. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-269-278 (In Russ.)]
13. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология. М.: Магистр-Пресс, 2013. 448 с. [Chereshnev V.A., Shmagel' K.V. Immunology [Immunology]. Moscow: Magistr-Press, 2013. 448 p.]
14. Allen R.C. Neutrophil leukocyte: combustive microbicidal action and chemiluminescence. *J. Immunol. Res.*, 2015, vol. 2015, 11 p. doi: 10.1155/2015/794072
15. Aranda A., Sequedo L., Tolosa L., Quintas G., Burello E., Castell J.V., Gombau L. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. In Vitro*, 2013, vol. 27, iss. 2, pp. 954–963. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.016
16. Back P., Matthijssens F., Vanfleteren J.R., Braeckman B.P. A simplified hydroethidine method for fast and accurate detection of superoxide production in isolated mitochondria. *Anal. Biochem.*, 2012, vol. 423, no 1, pp. 147–151. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.008
17. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, 2004, vol. 40, iss. 12, pp. 845–859. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005
18. Broxton C.N., Culotta V.C. SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 1: e1005295. doi: 10.1371/journal.ppat.1005295
19. Chae C.S., Teran-Cabanillas E., Cubillos-Ruiz J.R. Dendritic cell rehab: new strategies to unleash therapeutic immunity in ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2017, vol. 66, iss. 8, pp. 969–977. doi: 10.1007/s00262-017-1958-2
20. Chio I.I.C., Tuveson D.A. ROS in cancer: the burning question. *Trends Mol. Med.*, 2017, vol. 23, iss. 5, pp. 411–429. doi: 10.1016/j.molmed.2017.03.004
21. Cooper E.L. From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond. *Contrib. Microbiol.*, 2008, vol. 15, pp. 1–11. doi: 10.1159/000135680
22. Dehne N., Mora J., Namgaladze D., Weigert A., Brüne B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2017, vol. 35, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.coph.2017.04.007
23. Dzik J.M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim. Pol.*, 2010, vol. 57, no. 4, pp. 443–466.
24. Folkes L.K., Patel K.B., Wardman P., Wrona M. Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2009, vol. 484, iss. 2, pp. 122–126. doi: 10.1016/j.abb.2008.10.014
25. Granot Z., Jablonska J. Distinct functions of neutrophil in cancer and its regulation. *Mediators Inflamm.*, 2015, vol. 2015, 11 p. doi: 10.1155/2015/701067
26. Haselmayer P., Tenzer S., Kwon B.S., Jung G., Schild H., Radsak M.P. Herpes virus entry mediator synergizes with Toll-like receptor mediated neutrophil inflammatory responses. *Immunology*, 2006, vol. 119, no. 3, pp. 404–411. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02449.x
27. Havixbeck J.J., Wong M.E., More Bayona J.A., Barreda D.R. Multi-parametric analysis of phagocyte antimicrobial responses using imaging flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 2015, vol. 423, pp. 85–92. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.016
28. Hosaka S., Obuki M., Nakajima J., Suzuki M. Comparative study of antioxidants as quenchers or scavengers of reactive oxygen species based on quenching of MCLA-dependent chemiluminescence. *Luminescence*, 2005, vol. 20, iss. 6, pp. 419–427. doi: 10.1002/bio.867
29. Ichibangase T., Ohba Y., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂. *Luminescence*, 2014, vol. 29, iss. 2, pp. 118–121. doi: 10.1002/bio.2513
30. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts II L.J., Ischiropoulos H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, iss. 1, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
31. Kalyanaraman B., Dranka B.P., Hardy M., Michalski R., Zielonka J. HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes — the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, vol. 1840, iss. 2, pp. 739–744. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.008
32. Koul M., Kumar A., Deshidi R., Sharma V., Singh R.D., Singh J., Sharma P.R., Shah B.A., Jaglan S., Singh S. Cladosporol A triggers apoptosis sensitivity by ROS-mediated autophagic flux in human breast cancer cells. *BMC Cell Biol.*, 2017, vol. 18, no. 26, 15 p. doi: 10.1186/s12860-017-0141-0
33. Lyublinskaya O.G., Zenin V.V., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zemelko V.I., Domnina A.P., Litanyuk A.P., Burova E.B., Gubarev S.S., Negulyaev Y.A., Nikolsky N.N. Intracellular oxidation of hydroethidine: compartmentalization and cytotoxicity of oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 75, pp. 60–68. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.008
34. Maeda H., Yamamoto K., Nomura Y., Kohno I., Hafi L., Ueda N., Yoshida S., Fukuda M., Fukuyasu Y., Yamauchi Y., Itoh N. A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, no 1, pp. 68–69. doi: 10.1021/ja047018k

35. Mechnikov I.I. Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, vol. 10, no 1, pp. 223–227.
36. Pliyev B.K., Shmidt E.I., Ivanova A.V., Menshikov M. Circulating CD35⁻/CD49d⁺ neutrophils in influenza virus infection patients. *Hum. Immunol.*, 2012, vol. 73, no 11, pp. 1087–1090. doi: 10.1016/j.humimm.2012.07.327
37. Ramanathan S., Jagannathan N. Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J. Cancer Prev.*, 2014, vol. 7, no 1, pp. 1–8.
38. Robinson K.M., Janes M.S., Beckman J.S. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat. Protoc.*, 2008, vol. 3, no 6, pp. 941–947. doi:10.1038/nprot.2008.56
39. Saengmuang P., Kewcharoenwong C., Tippayawat P., Nithichanon A., Buddhisa S., Lertmemongkolchai G. Effect of host factors on neutrophil functions in response to *Burkholderia pseudomallei* in healthy Thai subjects. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 67, no 6, pp. 436–440.
40. Scharn C.R., Collins A.C., Nair V.R., Stamm C.E., Marciano D.K., Graviss E.A., Shiloh M.U. Heme oxygenase-1 regulates inflammation and mycobacterial survival in human macrophages during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, no 11, pp. 4641–4649. doi: 10.4049/jimmunol.1500434
41. Sikora J.P., Chlebna-Sokół D., Andrzejewska E., Chrul S., Polakowska E., Wysocka A., Sikora A. Clinical evaluation of pro-inflammatory cytokine inhibitors (sTNFR I, sTNFR II, IL-1 ra), anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) and activation of neutrophils after burn-induced inflammation. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 68, iss. 2, pp. 145–152. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02126.x
42. Sirokmány G., Donkó Á., Geiszt M. Nox/Duox family of NADPH oxidases: lessons from knockout mouse models. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016, vol. 37, iss. 4, pp. 318–327. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.006
43. Talib J., Maghzal G.J., Cheng D., Stocker R. Detailed protocol to assess in vivo and ex vivo myeloperoxidase activity in mouse models of vascular inflammation and disease using hydroethidine. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 97, pp. 124–135. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.004
44. Tripathi S., Wang G., White M., Rynkiewicz M., Seaton B., Hartshorn K. Identifying the critical domain of LL-37 involved in mediating neutrophil activation in the presence of influenza virus: functional and structural analysis. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no 8:e0133454. doi: 10.1371/journal.pone.0133454
45. Vowells S.J., Sekhsaria S., Malech H.L., Shalit M., Fleisher T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods*, 1995, vol. 178, no 1, pp. 89–97.
46. Wang J., Xu M., Chen M., Jiang Z., Chen G. Study on sonodynamic activity of metallophthalocyanine sonosensitizers based on the sonochemiluminescence of MCLA. *Ultrason. Sonochem.*, 2012, vol. 19, no 2, pp. 237–242. doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.06.021
47. Wang Y., Wang W., Xu H., Sun Y., Sun J., Jiang Y., Yao J., Tian Y. Non-lethal sonodynamic therapy inhibits atherosclerotic plaque progression in apoE^{-/-} mice and attenuates ox-LDL-mediated macrophage impairment by inducing heme oxygenase-1. *Cell Physiol. Biochem.*, 2017, vol. 41, no. 6, pp. 2432–2446. doi: 10.1159/000475913
48. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, vol. 43, iss. 7, pp. 995–1022. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026
49. Wardman P. Methods to measure the reactivity of peroxyxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines. *Methods Enzymol.*, 2008, vol. 441, pp. 261–282. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01214-7
50. Zielonka J., Kalyanaraman B. Hydroethidine- and mitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 48, iss. 8, pp. 983–1001. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028
51. Zielonka J., Lambeth J.D., Kalyanaraman B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, vol. 65, pp. 1310–1314. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.017

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;
Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;
Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Department of Fundamental Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.09.2017
 Принята к печати 20.09.2017

Received 07.09.2017
 Accepted 20.09.2017