

ОСОБЕННОСТИ ЛЮМИНОЛ- И ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РИНОСИНОСИТОМ

Коленчукова О.А.¹, Савченко А.А.², Смирнова С.В.¹

¹ Лаборатория молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск

² Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского Федерального Университета, г. Красноярск

Резюме. Проведено исследование особенностей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при люминол- или люцигенин-зависимой хемилюминесценции у больных хроническим риносинуситом. Обнаружено увеличение скорости образования активных форм кислорода (АФК) как при спонтанной, так и при зимозан-индуцированной хемилюминесцентной реакции, где в качестве активатора участвует люминол и определяется суммарная функциональная активность нейтрофилов. В тоже время в хемилюминесцентном процессе, активатором которой является люцигенин, отвечающий за образование супероксидного анион-радикала обнаружена замедленная реакция образования АФК как при спонтанном, так и при зимозан-индуцированном ответе. Можно утверждать, что при исследуемом патологическом процессе реакция формирования активных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах идет в большей степени по миелопероксидазному пути.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, люминол, люцигенин, активные формы кислорода, риносинусит.

Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V.

FEATURES OF LUMINOL- AND LUCIGENIN-INDUCED CHEMILUMINESCENCE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS

Abstract. Studies of functional activity of neutrophilic granulocytes from patients with chronic rhinosinusitis was performed using luminol- or lucigenin-dependent chemiluminescence. We have revealed increased production of reactive oxygen species (ROS) both under basal conditions, and in zymozan-induced chemiluminescent reaction, employing luminol as an activator, and determining total functional activity of neutrophils. Meanwhile, in lucigenin-induced chemiluminescence associated with production of superoxide anion radicals, a delayed ROS production was revealed, both in spontaneous and zymozan-induced response. One may suggest that, when studying these pathological events in neutrophils, ROS production in the cells proceeds mostly by myeloperoxidase pathway. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 437-440)

Keywords: neutrophilic granulocytes, luminol, lucigenin, reactive oxygen species, rhinosinusitis.

Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна
ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН
660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г.
Тел.: (391) 228-06-83.
Факс: (391) 228-06-83.
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru;
aasavchenko@yandex.ru

Введение

Одним из первых этапов при взаимодействии организма с чужеродным объектом являются реакции так называемого «неспецифического иммунитета», в частности «дыхательный взрыв». Под этим термином понимают резкое увеличение потребления

кислорода за счет преобразования его в активные формы кислорода клетками-фагоцитами [2, 4].

Фагоцитоз является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов и играет важную роль при гнойно-воспалительных заболеваниях, особенно при бактериальной инфекции [1, 6]. Несомненным преимуществом является применение в хемилюминесцентной реакции зимозана в качестве неспецифического индуктора дыхательного взрыва, который представляет собой вещество бактериальной природы (полисахарид, получаемый из культуры *Saccharomyces cerevisiae*) [1, 10].

Выделение активных форм кислорода (АФК) направлено на уничтожение чужеродных объектов, при этом, недостаточное образование АФК может свидетельствовать о слабости защитных сил организма [2, 5]. Таким образом, способность нейтрофильных гранулоцитов образовывать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки дальнейшего хода воспалительного процесса, а ответ на стандартный стимул может характеризовать активность защитных сил организма [3, 7, 9].

Существуют различные способы оценки образования АФК. Одним из наиболее чувствительных является хемилюминесцентный метод, особенно после открытия активаторов хемилюминесценции (ХЛ), из которых наиболее широко используются люминол и люцигенин. Известно, что существует химическая специфичность активаторов: люминол вступает в реакцию с АФК образуемыми различными ферментами, а люцигенин — только с супероксидным анион-радикалом [2, 8].

Таким образом, целью данного исследования явилась оценка люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 70 больных с обострением хронического верхнечелюстного риносинусита (ХРС) в возрасте от 18 до 45 лет. Контрольную группу составили 100 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов оценивали с помощью хемилюминесцентного метода по методу De Sole P. et al. (1983). Из венозной крови обследуемого пациента выделяли нейтрофильные гранулоциты. Для этого к 5 мл крови с гепарином добавляли 1 мл полиглюкина и инкубировали в течение

30 мин при 37 °С для ускорения осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость наслаивали на двойной градиент плотности фиколла-верографин ($\rho = 1,077$ для выделения популяции лимфоцитов; $\rho = 1,199$ для выделения популяции нейтрофильных гранулоцитов) и центрифугировали при 400 g в течение 45 минут. При контроле морфологического состава лейкоцитарных взвесей определяют чистоту выхода нейтрофильных гранулоцитов, которая составляла 97%. Полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. Супернатант сливали, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводили в 1 мл раствора Хенкса и получали взвесь. Подсчитывали количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева. Для хемилюминесцентного анализа использовали 2×10^6 клеток. Измеряли величину спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) нейтрофилов, которая характеризует базальный уровень активации этих клеток. Для определения резервных возможностей активации нейтрофилов осуществляли стимуляцию кислородного метаболизма посредством добавления к ним опсонизированного зимозана. Опсонизированный зимозан готовили следующим образом: сливную свежую гепаринезированную кровь полученную от 40 здоровых доноров, имеющих IV группу крови и (-) резус фактор, центрифугировали в течение 5 мин при 500 g, забирали плазму в отдельную пробирку. Затем к 60 мг зимозана добавляли 7 мл плазмы и 7 мл раствора Хенкса, тщательно суспензировали, инкубировали в течение 60 мин в термостате при 37 °С, встряхивая через каждые 5 мин. Затем отмывали центрифугированием по 5 мин при 400g 3 раза, отбирая надосадочную жидкость. К отмытой надосадочной жидкости добавляли 30 мл раствора Хенкса и отбирали необходимое количество опсонизированного зимозана для хемилюминесцентной реакции.

В качестве усилителей люминесценции использовали люминол и люцигенин. Люминол-усиленная хемилюминесценция регистрировала весь пул АФК и отражала суммарную активность миелопероксидазы и NADPH-оксидазы и др., а люцигенин-усиленная хемилюминесценция измеряла образование супероксидного анион-радикала ($\cdot O_2^-$) и оценивала активность NADPH-оксидазы.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (Россия). Определяли сле-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РИНОСИНУСИТОМ (Ме (С25-С75))

Показатели	Контроль n = 100	ХРС n = 70	p
Хемилюминесценция спонтанная			
Tmax, (с.)	1218,2 (636; 1545)	1283 (526; 1947)	
I _{max} , (о.е. x 10 ³)	13,1 (3,1; 14,9)	27,7 (6,9;38,4)	p < 0,001
S1 (о.е. x 10 ³)	513,8 (110; 565,5)	2839,4 (194; 4730)	p < 0,001
Хемилюминесценция, индуцированная зимозаном			
Tmax (с.)	1276 (814; 1526)	1159 (544; 1601)	
I _{max} (о.е. x 10 ³)	24,8 (6,2; 26,5)	42,2 (12,5; 68,9)	p < 0,001
S2 (о.е. x 10 ³)	652,3 (171; 971)	4292,8 (469; 4560)	p < 0,001
ИА	2 (1,3; 2,4)	2 (0,9; 2)	

дующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), площадь кривой (S2). Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через компьютер.

Результаты и обсуждение

Изучение параметров хемилюминесценции у больных ХРС выявило увеличение скорости максимального образования АФК как при спонтанной, так и при зимозан-индуцированной хемилюминесцентной реакции, где в качестве активатора участвует люминол и регистрируется весь пул АФК и отражается суммарная активность ферментов синтезирующих АФК относительно группы контроля. Так, происходит увеличение интенсивности и площади под кривой при спонтанном и зимозан-индуцированном хемилюминесцентном процессе относительно лиц контрольной группы (табл. 1).

Таким образом, на фоне базовой повышенной функциональной активности дополнительная стимуляция «респираторного взрыва» нейтрофилов опсонизированным зимозаном приводит к соответствующему увеличению продукции АФК нейтрофильными гранулоцитами крови, что отражает повышенные резервные метаболические возможности данной клеточной популяции больных ХРС.

Изучение параметров спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови позволило обнаружить у больных ХРС статистически значимое замедление реакции образования АФК, по сравнению с аналогичными параметрами здоровых людей (табл. 2). Так при спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ происходит снижение времени выхода на пик. Что свидетельствует о снижении скорости образования супероксидного анион радикала (O₂⁻) и таким образом низкой активности NADPH-оксидазы.

При сравнительном анализе люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов крови у больных ХРС и лиц контрольной группы обнаружено, что интенсивность люминол-зависимой реакции зна-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РИНОСИНУСИТОМ (Ме (С25-С75))

Показатели	Контроль n = 100	ХРС n = 70	p
Хемилюминесценция спонтанная			
Tmax, (сек.)	2781,6 (2010;3791)	1804 (1006,5;2537)	p < 0,001
I _{max} , (о.е. x 10 ³)	10,9 (2,5;14,1)	8,6 (1,3;12,8)	
S1, (о.е. x 10 ³)	441,6 (91,6;586)	824,1 (57,6;745)	
Хемилюминесценция, индуцированная зимозаном			
Tmax, (сек.)	2227,5 (1651;2722)	1797 (1272;2244)	p < 0,05
I _{max} , (о.е. x 10 ³)	22,9 (7,7;27,7)	14,9 (4,6;21,9)	
S2, (о.е. x 10 ³)	726,6 (251;890)	1381,2 (318;1635)	
ИА	3,2 (1,2;3,6)	4 (1,2;4)	

чительно выше люцигенин-зависимого хемиллюминесцентного процесса. Можно утверждать, что при хроническом риносинусите основную функцию формирования активных радикалов кислорода в нейтрофильных гранулоцитах берет на себя миелопероксидаза. Известно, что формирование супероксидных радикалов связано с мембранной NADPH-оксидазой. Источником NADPH в нейтрофильных гранулоцитах является преимущественно гексозомонофосфатный путь окисления углеводов. Кроме того, значительную роль в формировании активных радикалов кислорода в нейтрофилах играет миелопероксидазный путь. Люминол-усиленная ХЛ формируется в основном системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность кислородных и других радикалов, люцигенин окисляется и люминесцирует под влиянием преимущественно супероксидного аниона [4, 10]. Необходимо заметить что, миелопероксидазный путь формирования активных радикалов кислорода у нейтрофилов существенно превалирует над другими механизмами, отсюда и выявляется наибольший уровень люминол-зависимой хемиллюминесцентной активности клеток.

Заключение

В результате исследования функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных ХРС хемиллюминесцентным методом, в котором в качестве активатора участвует люминол выявлено увеличение интенсивности образования АФК как при спонтанной хемиллюминесцентной реакции, так и в нагрузочных тестах относительно группы контроля. В случае, где активатором хемиллюминесцентного процесса служит люцигенин и определяется активность только NADPH-оксидазы, обнаружено снижение интенсивности хемиллюминесцентной реакции в спонтанных и зимозан индуцированных тестах. Таким образом, можно с уверенностью отметить, что при хроническом риносинусите формирование свободных форм кислорода в нейтрофильных гранулоцитах идет в большей степени по миелопероксидазному пути.

Список литературы

1. Грачева Т.А., Бондарев В.П., Дармов И.В., Нестеров Г.Н. Способ диагностики специфической сенсibilизации организма человека к бактериальным антигенам по показателям хемиллюминесцентного свечения нейтрофилов // Иммунология. — 2007. — № 5. — С. 297-299.
2. Грачева Т.А. Совершенствование хемиллюминесцентного метода исследования функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 2. — С. 54-55.

3. Попов Н.Н., Огневенко Е.В., Романова Е.А. Особенности функционирования системы фагоцитарных клеток больных верхнечелюстным синуситом, страдающим сахарным диабетом // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10. — № 2-3. — С. 145-150.

4. Рудой Б.А., Грачева Т.А., Рассанов В.П., Медведев Н.П. Использование метода регистрации хемиллюминесценции нейтрофилов для оценки сенсibilизации лабораторных животных, иммунизированных бруцеллезной вакциной // Иммунология. — 2005. — № 3. — С. 191-193.

5. Тарасов А.А., Каманин Е.И., Крюков А.И., Страчунский Л.С. Острый бактериальный риносинусит: современные подходы к диагностике и антимикробной терапии в амбулаторных условиях // Вестник оториноларингологии. — 2003. — № 2. — С. 46-54.

6. Тюрин-Кузьмин А.Ю. Ячейка для хемиллюминесцентного анализа взаимодействия клеток крови с макроскопической твердой поверхностью // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 6. — С. 36-39.

7. Саидов М.З., Джамалудинов Ю.А., Даудов Х.Ш., Нажмудинов И.И. Изучение состояния макрофагального звена местного иммунитета у часто болеющих детей с патологией ЛОР-органов // Иммунология. — 2007. — № 5. — С. 303-307.

8. Швыдченко И.Н., Нестерова И.В., Синельникова Е.Ю. Цитосекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов // Иммунология. — 2005. — № 1. — С. 31-34.

9. Prestwich R.J., Errington F., Hatfield P., Roodman D.G. The immune system — is it relevant to cancer development, progression and treatment? // Clin. Oncol. (R. Coil. Radiol.). — 2008. — Vol. 20. — P. 101-112.

10. Schins R.P.F., Borm P.J.A., Van Schooten F. J Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review // Mutagenesis. — 2006. — Vol. 21. — P. 225-236.

11. Stewart T.J., Greenelch K.M, Lutsiak M.E., Abrams S. I. Immunological responses can have both pro- and antitumor effects: implications for immunotherapy // Expert. Rev. Mol. Med. — 2007. — Vol. 9. — P. 1-20.

12. Viola A., Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses // Semin. Cancer Biol. — 2007. — Vol. 17. — P. 309-316.

13. Yamashita S., Suzuki A., Yanagita T., Ueta E., Osaki T. Analysis of neutrophil proteins of patients with Behcet's disease by two-dimensional gel electrophoresis // Biol. Pharm. Bull. — 2000. — Vol. 23. — P. 519-522.

поступила в редакцию 08.02.2010

отправлена на доработку 15.02.2010

принята к печати 02.03.2010