

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И
АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ В КОМЕ**

Проскурнина Е. В.

*д. м. н., доцент, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной
биологии*

*Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.Бочкова,
Москва, Россия
proskurnina@gmail.com*

Гришина Н. К.

*врач ультразвуковой диагностики
лечебно-диагностический центр 9 Министерства обороны Российской
Федерации, Москва, Россия
arexaricisim2007@mail.ru*

Созарукова М. М.

*к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории синтеза
функциональных материалов и переработки минерального сырья
Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова
Российской академии наук, Москва, Россия
S_MadinaM@bk.ru*

Подлепич В. В.

*врач анестезиолог-реаниматолог,
Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н.Н.Бурденко Минздрава РФ Москва, Россия
podlepichv@gmail.com*

Портнова Г. В.

*к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории высшей нервной
деятельности человека
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской
академии наук, Москва, Россия
caviter@list.ru*

Вовлечение нейтрофильного звена иммунитета — важный фактор в патогенезе тяжелой черепно-мозговой травмы и вторичного воспалительного повреждения нейронов. Цель исследования — изучить варианты окислительного ответа нейтрофилов у пациентов в коме и сопоставить с антиоксидантным потенциалом плазмы крови. Показано, что паттерн окислительного ответа нейтрофилов является чрезвычайно вариабельным, что обуславливает целесообразность его исследования по многоканальному протоколу, включающему как регистрацию базального ответа, так и регистрацию ответа после единичного или двухстадийного стимулирования. Для пациентов в коме характерна антиоксидантная недостаточность плазмы крови, не связанная с повышением активности нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы; антиоксидантный профиль; плазма крови;
кома

OXIDATIVE ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF BLOOD PLASMA IN COMA

Proskurnina E. V.

*Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Molecular
Biology
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia
proskurnina@gmail.com*

Grishina N. K.

*MD, ultrasound specialist
Diagnostic and treatment center 9 of the Ministry of Defense of the Russian
Federation, Moscow, Russia
apexapicism2007@mail.ru*

Sozarukova M. M.

*Candidate of Chemistry, Junior Researcher, Laboratory for Synthesis of
Functional Materials and Processing of Mineral Raw Materials
Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia
S_MadinaM@bk.ru*

Podlepich V. V.

*MD, anesthesiologist-resuscitator,
Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow,
Russia
podlepichv@gmail.com*

Portnova G. V.

*MD, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of
Human Higher Nervous Activity, Institute of Higher Nervous Activity and
Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
caviter@list.ru*

Involvement of the neutrophils is an important factor in the pathogenesis of severe traumatic brain injury and secondary inflammatory neuronal damage. The aim of the study was to study the variants of the oxidative response of neutrophils in patients in coma and compare them with the antioxidant potential of blood plasma. It has been shown that the pattern of the oxidative response of neutrophils is extremely variable, which makes it necessary to study it using a multichannel protocol, including both the registration of the basal response and the registration of the response after a single or two-stage stimulation. For patients in coma, antioxidant deficiency of blood plasma is characteristic, which is not associated with an increase in neutrophil activity.

Keywords: neutrophils; antioxidant profile; blood plasma; coma

Черепно-мозговая травма является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности. Нейтрофильно-лимфоцитарное отношение

является объективным, доступным, недорогим и воспроизводимым маркером воспаления и вторичного повреждения ткани головного мозга нейтрофилами. Данные свидетельствуют о том, что более высокое значение отношения является независимым предиктором плохих исходов у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой и коррелирует с более низкими показателями по шкале комы Глазго [1]. Однако этот индекс учитывает число нейтрофилов, но не их активность. Для оценки активности перспективными являются хемилюминесцентные методы. Поскольку нейтрофилы являются основными источниками активных форм кислорода в крови, их повышенная активность может вызвать истощение антиоксидантной защиты плазмы.

Цель исследования — изучить варианты окислительного ответа нейтрофилов у пациентов в коме при помощи оригинального протокола и сопоставить с антиоксидантным потенциалом плазмы крови.

Материалы и методы

Пациенты. В исследовании приняли участие 7 пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой, находящихся в коме (мужчины, возраст $32 \pm 9,5$ лет). Пациенты находились в подострой фазе после травмы (от 7 дней до 3 месяцев, среднее $28,7 \pm 5,4$ дней). Критерии включения — от 4 до 8 баллов по шкале комы Глазго ($5,8 \pm 1,3$). Критерии исключения — возраст моложе 18, наличие в анамнезе неврологических или психических заболеваний.

Анализ окислительной активности нейтрофилов. Измерения хемилюминесценции проводили с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Окислительную активность нейтрофилов оценивали по 6-канальному протоколу, включающему параллельную регистрацию спонтанной хемилюминесценции в присутствии люминола или люцигенина, ответ нейтрофилов после одностадийной стимуляции форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) или *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) в присутствии люминола или люцигенина, и последовательную двухстадийную стимуляцию ФМА+фМЛФ в присутствии люминола (описан в [2]). Из хемилюминограмм рассчитывали ряд показателей и коэффициентов (табл. 1).

Таблица 1. - Протоколы стимуляции и рассчитываемые параметры

№	Активатор	Стимул	Параметр	Коэффициенты активации
1	Люминол	—	$A_{\text{люом}}$	
2	Люминол	ФМА	$A_{\text{ФМАлюом}}$	$K_{\text{ФМАлюом}} = A_{\text{ФМАлюом}}/A_{\text{люом}}$
3	Люминол	фМЛФ	$A_{\text{фМЛФ}}$	$K_{\text{фМЛФ}} = A_{\text{фМЛФ}}/A_{\text{люом}}$
4	Люминол	ФМА+фМЛФ	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}$	$K_{\text{ФМА+фМЛФ}} = A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{люом}}$
5	Люцигенин	—	$A_{\text{люоц}}$	
6	Люцигенин	ФМА	$A_{\text{ФМАлюоц}}$	$K_{\text{ФМАлюоц}} = A_{\text{ФМАлюоц}}/A_{\text{люоц}}$

Дополнительно рассчитывали индексы, отражающие соотношение люминол- и люцигенин-активированной хемилюминесценции ($A_{\text{люом}}/A_{\text{люоц}}$,

$A_{\text{ФМАлюм}}/A_{\text{ФМАлюц}}$), соотношение интенсивностей двухстимульного и одностимульного ответа ($A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{ФМАлюм}}$, $A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{фМЛФ}}$),

Антиоксидантный профиль плазмы крови. Антиоксидантную активность образца плазмы определяли методом активированной хемилюминесценции в системе генерации свободных радикалов 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (Sigma-Aldrich) в присутствии люминола (Sigma-Aldrich) [3]. В качестве аналитических параметров определяли площадь депрессии сигнала S , образующегося в результате действия сильных антиоксидантов плазмы (мочевая кислота и аскорбат) и параметр ΔI , представляющий разность между новым (I) и начальным (I_0) стационарными уровнями и отражающий емкость слабых антиоксидантов.

Результаты и обсуждение.

Пример регистрации окислительной активности нейтрофилов пациента в коже по 6-канальному протоколу приведен на рис. 1. Амплитуды ответа (см. табл. 1) были определены как значение хемилюминесценции в максимуме.

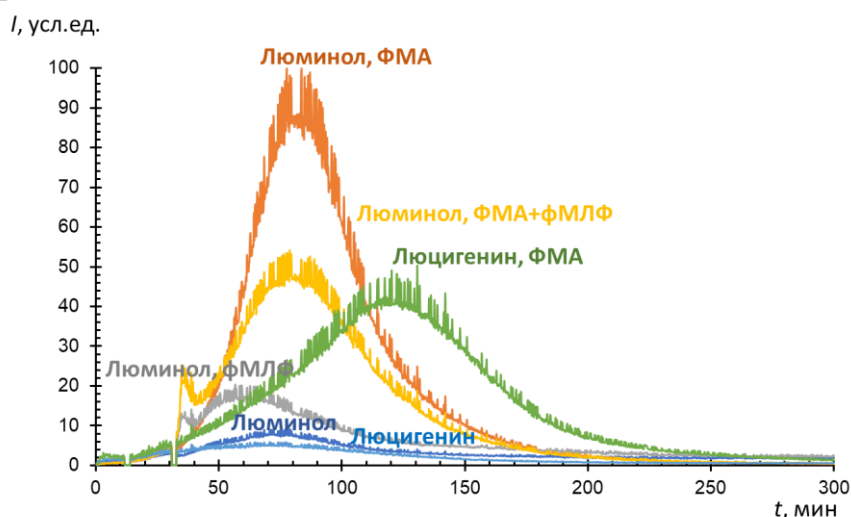


Рисунок 1. Хемилюминограммы окислительного ответа нейтрофилов пациента в коже, зарегистрированные по 6-канальному протоколу.

Рассчитанные параметры и индексы качественно сравнили с ранее определенными паттернами нормального ответа. Основные патогенетически значимые различия приведены в табл. 2.

Таблица 2. - Патогенетически значимые параметры окислительного ответа нейтрофилов

Пациент	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*$	$A_{\text{люм}}/A_{\text{люц}}$	$A_{\text{ФМАлюм}}/A_{\text{ФМАлюц}}$	$A_{\text{ФМА+фМЛФ}}/A_{\text{ФМАлюм}}$	S
Ч1.	↓	>1	>1	>1	0,5N
П.	↓	<1	<1	<1	0,5N
М.	↑	<1	<1	<1	0,5N
К1.	↓	>1	>1	<1	0,7N
К2.	↑↑↑	>1	>1	>1	0,7N

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

Ч2.	N	>1	>1	<1	N
P.	↑↑	>1	>1	<1	0,7N

* качественно по отношению к референтному интервалу

Из данных следует значительная вариабельность окислительного ответа нейтрофилов, которую сложно связать с каким-либо лабораторным или инструментальным параметром вследствие чрезвычайной сложности патогенеза. Активность нейтрофилов может быть снижена, соответствовать норме, быть повышенной или резко повышенной. Корреляции с баллами по шкале комы Глазго выявлено не было.

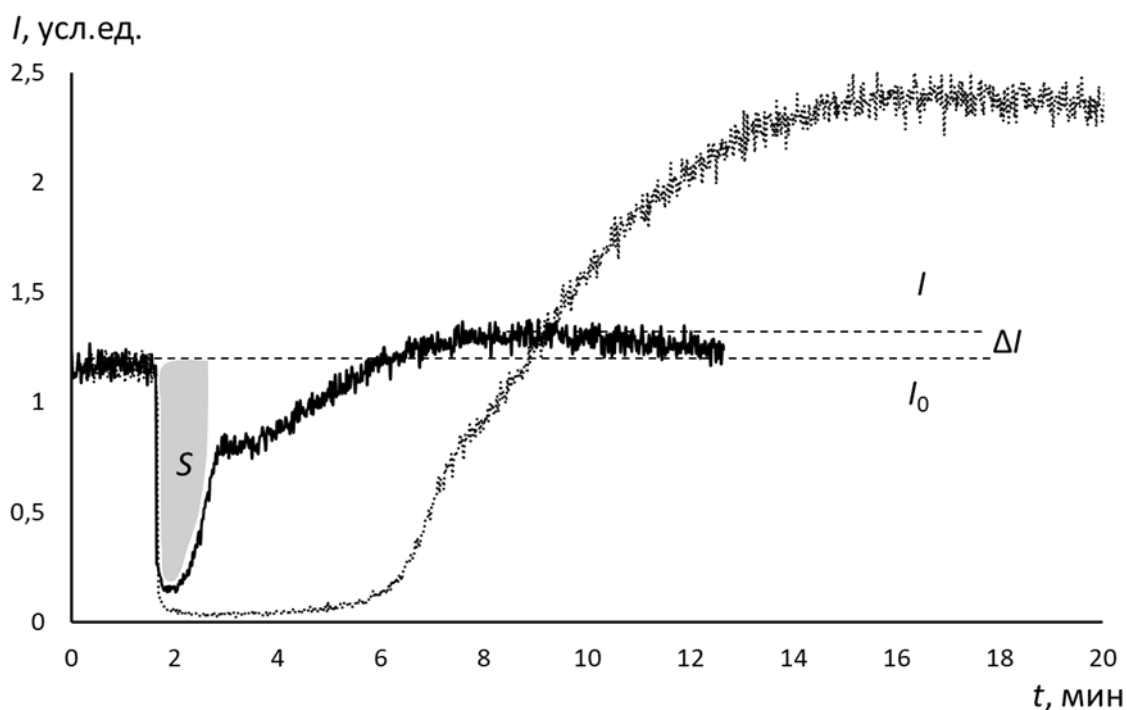


Рисунок 2. Антиоксидантный профиль плазмы крови пациента в коме (черный контур) и практически здорового донора (серый контур), показан принцип расчета определяемых параметров S («уратная емкость») и ΔI («тиоловая» емкость).

«Уратная» антиоксидантная емкость в большинстве случаев (6 пациентов из 7) была значимо снижена (табл. 2), что свидетельствует о выраженном окислительном стрессе (референтный интервал [195; 405]) (см. рис. 2). «Тиоловый» окислительный стресс был значимо выражен у всех пациентов (среднее значение 0,33, SD = 0,24, референтный интервал [1,2-2,2]). Коэффициентов корреляции между активностью нейтрофилов и антиоксидантного профиля не было найдено, что свидетельствует о независимости этих параметров.

Заключение. Для такого патогенетически сложного состояния, как кома, во всех случаях не наблюдали единообразного паттерна окислительного ответа нейтрофилов — у каждого пациента был свой уникальный профиль, поэтому

для адекватной оценки активности нейтрофилов целесообразно проводить измерения по нескольким протоколам, включающим как регистрацию базального ответа, так и регистрацию ответа после единичного или двухстадийного стимулирования. Окислительный стресс в «уратном» и особенно «тиоловом» звене характерен для этих пациентов, хотя не является прямым следствием повышения активности нейтрофилов. Следует в дальнейшем изучить этот вопрос в аспекте целесообразности нутритивной поддержки антиоксидантами.

Список литературы

1. Sabouri E., Majdi A., Jangjui P., Rahigh Aghsan S., Naseri Alavi S. A. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Traumatic Brain Injury: A Review Study // *World Neurosurgery*. — 2020. — V. 140. — P. 142–147.
2. Образцов И. В., Годков М. А., Полимова А. М., Дёмин Е. М., Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // *Российский иммунологический журнал*. — 2015. — Т. 9 (18), № 4. — С. 418–425.
3. Алексеев, А. В., Проскурнина, Е. В., Владимиров, Ю. А. // Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). *Вестник Московского ун-та, сер: Химия*. 2012. — Т. 53. — С. 187–193.