

**ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ
ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С
ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Е.В. Глотова, Н.Н. Барсков, В.В. Аброськин, Т.А. Дружинина

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Пенза, Россия

Лаборатория молекулярной и персонализированной медицины

Кафедра медицинской микробиологии и лабораторной медицины

Кафедра неврологии, рефлексотерапии и физиотерапии с курсом физической и
реабилитационной медицины

Научные руководители – к.б.н., доцент О.А. Левашова, к.м.н., доцент И.Г.

Золкорняев

Резюме. Проведено изучение функциональной активности нейтрофилов по показателям люминолзависимой хемилюминесценции у пациентов с ишемическим инсультом в остром периоде заболевания при последовательной стимуляции нейтрофилов форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцилфенилаланином (фМЛФ) с последующей регистрацией результатов на хемилюминометре Lum-1200. Обследовано 28 пациентов с ишемическим инсультом легкой и средней степени тяжести в первые сутки развития заболевания. повышение показателей, характеризующих функциональную активность нейтрофилов по спонтанной и стимулированной продукции активных форм кислорода (АФК), свидетельствует об активации свободнорадикальных процессов у больных ИИ.

Ключевые слова: нейтрофилы, хемилюминесценция, ишемический инсульт.

**ASSESSMENT OF NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY
BY CHEMILUMINESCENCE IN PATIENTS WITH ISCHAEMIC STROKE IN THE
ACUTE PERIOD OF THE DISEASE**

E.V. Glotova, N.N. Barskov, V.V. Abroskin, T.A. Druzinina

Penza Institute of Advanced Medical Studies – branch of the Federal State Government-financed Educational Establishment of Additional Professional Education “Russian Medical Academy of Life-long Professional Learning” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Penza, Russia

Laboratory of Molecular and Personalised Medicine

Department of Medical Microbiology and Laboratory Medicine

Department of Neurology, Reflexology and Physiotherapy with a Course of Physical and
Rehabilitation Medicine

Abstract. The functional activity of neutrophils according to the indicators of luminol-dependent chemiluminescence in patients with ischaemic stroke in the acute period of the disease was studied during sequential stimulation of neutrophils with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and N-formylmethionyl-leucylphenylphenylalanine (fMLP) with the subsequent registration of the results on the chemiluminometer Lum-1200. 28 patients with ischaemic stroke of mild and moderate severity on the first day of the disease development were examined. The increase in the indices characterising the functional activity of neutrophils in spontaneous and stimulated production of reactive oxygen species (ROS) indicates the activation of free-radical processes in AI patients.

Key words: neutrophils, chemiluminescence, ischemic stroke.

Введение. Нейтрофилы являются одними из основных типов клеток врождённого иммунитета и участвуют в различных иммунных и воспалительных процессах. Накопленные данные свидетельствуют о том, что нейтрофилы задействованы в патогенезе широкого спектра заболеваний человека, включая инфекционные и неинфекционные заболевания, в том числе ишемический инсульт [1, 2]. Проникая в зону ишемии, эти полиморфноядерные клетки способны инициировать вторичное повреждение ткани мозга из-за высвобождения различных провоспалительных факторов, генерации активных форм кислорода [3]. Выяснение функциональных характеристик нейтрофилов по их способности продуцировать свободные радикалы может способствовать открытию новых потенциальных терапевтических стратегий.

Цель исследования: изучение функциональной активности нейтрофилов по показателям люминолзависимой хемилюминесценции у пациентов с ишемическим инсультом в остром периоде заболевания.

Материалы и методы. Обследовано 28 больных ишемическим инсультом, поступивших в первые сутки от появления первых симптомов заболевания с инсультом легкой и средней степени тяжести с количеством баллов по шкале NIHSS до 14 включительно (средний балл 6 [4, 5]) и давших согласие на участие в исследовании. Возраст обследованных пациентов составил 69,0 [63,3; 76,6] лет. Тип ИИ подтверждался методами нейровизуализации – компьютерной томографией (КТ). Критерием исключения: пациенты, имеющие в анамнезе онкологическую патологию, страдающие эпилепсией, злоупотребляющие психоактивными веществами. Для оценки тяжести неврологического дефицита использовали шкалу инсульта Национального института здоровья (NIHSS). Определение лабораторных показателей осуществлялось в первые сутки. Изучение функциональной активности нейтрофилов в цельной венозной крови проводили по методу Образцова И.В. и соавт. [6], при котором происходит последовательная стимуляция нейтрофилов двумя стимулами: форбол-12-

миристал13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцилфенилаланином (фМЛФ) с последующей регистрацией результатов на хемиллюминиметре Lum-1200 (ДИСофт, Россия). О кинетике генерации активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами периферической крови судили по следующим параметрам: абсолютное количество нейтрофилов (10^9 /л клеток), светосумма спонтанной и стимулированной продукции нейтрофилов ($S_{\text{спонт.}}$, $S_{\text{ФМА}}$, $S_{\text{фМЛФ}}$ соответственно), максимальное значение интенсивности спонтанного и стимулированного свечения ($I_{\text{max спонт.}}$, $I_{\text{max ФМА}}$, $I_{\text{max фМЛФ}}$ соответственно). В группу контроля вошли 10 человек сопоставимого возраста, с отсутствием в анамнезе перенесенных ранее острых ишемических эпизодов (ишемического инсульта, инфаркта миокарда).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов непараметрического анализа. Совокупности количественных показателей описывались при помощи значений медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей. Сравнение двух независимых групп проводилось по критерию Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ишемическим инсультом легкой и средней степени тяжести

Показатель	Пациенты с ИИ	Контрольная группа	Достоверность
Нейтрофилы, абс. кол-во, 10^9 /л	[]	[]	
спонт., PPS	[]	[]	
ФМА, PPS	[]	[]	
фМЛФ, PPS	[]	[]	
общ., PPS	[]	[]	
I	[]	[]	
I	[]	[]	
I	[]	[]	

Как следует из представленных данных, не обнаружено достоверных различий в уровне абсолютного количества нейтрофилов у пациентов с ИИ по сравнению с контролем. Показатель, характеризующий спонтанную активность нейтрофилов – светосумма ($S_{\text{спонт.}}$), был достоверно выше у обследованных пациентов. Регистрируемые сигналы при последовательной стимуляции нейтрофилов ФМА и фМЛФ также были статистически значимо выше у пациентов с ИИ и, как следствие, показатель, описывающий светосумму за весь период наблюдения, был выше в группе больных. Максимальные значения интенсивности свечения у обследованных пациентов после

добавления ФМА и фМЛФ также статистически значимо превышали контроль. Типичные хемилуминограммы представлены на рисунке 1.

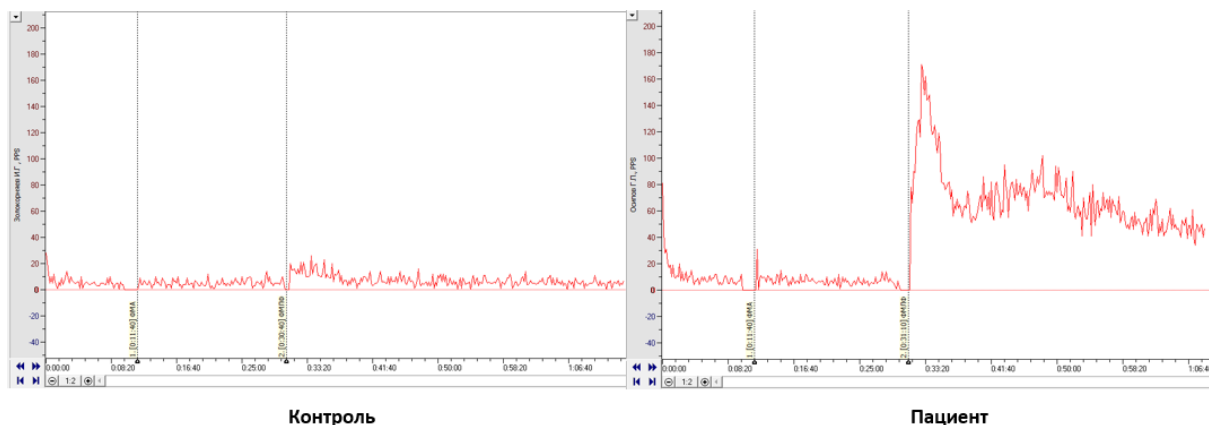


Рисунок 1 – Хемилуминограммы крови здорового человека и пациента с ишемическим инсультом

Обсуждение. Важными патофизиологическими механизмами при развитии острой недостаточности мозгового кровообращения являются воспалительный процесс и окислительный стресс, инициированные ишемией. При моделировании ИИ было показано, что нейтрофилы как основные эффекторные клетки острого воспаления, проникают в зону повреждения мозговой ткани уже через несколько минут, достигая пика на третьи сутки [1, 4]. Миграция полиморфноядерных лейкоцитов в зону повреждения сопровождается их выраженной активацией, что было отмечено в проведенном исследовании. Проникая в зону ишемизированной ткани головного мозга, нейтрофилы инициируют вторичное повреждение из-за высвобождения провоспалительных факторов, активных форм кислорода, протеаз и др. [7]. Согласно литературным данным, значительный вклад в генерацию АФК вносят НАДФН-оксидазы [8], обуславливающие функциональную активность нейтрофилов за счет реализации респираторного взрыва [9]. В ходе этого процесса происходит усиление синтеза АФК фагоцитирующими клетками. В понятие АФК на сегодняшний день включают широкий спектр реакционно-активных форм соединений кислорода (радикалы, анионы), связанных с первичным синтезом супероксид-радикала [5]. В нашем исследовании повышение показателей, характеризующих функциональную активность нейтрофилов по спонтанной и стимулированной продукции АФК, свидетельствует об активации свободнорадикальных процессов у больных ИИ, обусловленных ростом уровня провоспалительных цитокинов и активацией медиаторных систем плазмы.

Использование метода определения хемилуминесцентной активности нейтрофилов позволяет проанализировать особенности процесса респираторного взрыва в спонтанном и индуцированном состоянии при острой ишемии головного мозга. Особенностью данного подхода с

двухстадийной стимуляцией нейтрофилов является то, что на первом этапе осуществляется праймирование фагоцитов за счет воздействия ФМА, на втором - взаимодействие фМЛФ со специфическими рецепторами приводит к немедленной выработке АФК во внеклеточную среду НАДФ-Н-оксидазными комплексами, находящимися на плазматической мембране. Так, фМЛФ действует на рецепторы, получившие название «рецепторы формилированных пептидов» [10]. Основная функция этих рецепторов связана с хемотаксисом полиморфноядерных лейкоцитов к очагу инфекции или деструкции ткани для последующей элиминации.

Выводы. Использование метода определения хемилюминесцентной активности нейтрофилов в острой стадии ишемического инсульта позволяет проанализировать особенности процесса респираторного взрыва в спонтанном и индуцированном состоянии.

Список литературы

1. Долгушин И.И., Зарипова З.З., Карпова М.И. Роль нейтрофилов в патогенезе ишемического инсульта. Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т 20. – № 3. – С. 152–160.
2. Ruhnau J., Schulze J., Dressel A., Vogelgesang A. Thrombosis, neuroinflammation, and poststroke infection: The multifaceted role of neutrophils in stroke. *Journal of Immunology Research*. – 2017– Vol. 141. – P. 1-7.
3. Мартынов М.Ю., Журавлева М.В., Васюкова Н.С. Кузнецова Е.В., Каменева Т.Р. Окислительный стресс в патогенезе церебрального инсульта и его коррекция. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2023. – Т. 123. – № 1. – С. 16–27.
4. Neumann J., Riek-Burchardt M., Herz J., Doeppner T.R., König R., Hütten H., Etemire E., Männ L., Klingberg A., Fischer T., Görtler M.W., Heinze H.J., Reichardt P., Schraven B., Hermann D.M., Reymann K.G., Gunzer M. Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol*. – 2015. – Vol.129. – P. 259-277.
5. 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.
6. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М. Демин 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.
7. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. – 2019. – Vol. 16(1) – P.142.
8. Yang, C., Hawkins K.E., Dore S. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2019. – Vol. 316. – P.135-153.

9. Rossi F., Bellavite P., Berton G., Dri P., Zabucchi, G., Basford R.E. The Respiratory Burst of Phagocytic Cells: Facts and Problems. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 1982. – Vol. 141. – P.283-322.

10. Jazayeri A., Dias J.M., Marshall F.H. From G protein-coupled receptor structure resolution to rational drug design. *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – №32. – P. 19489-19495.