

Особенности метаболического обеспечения респираторного взрыва нейтрофилов крови и мокроты у больных внебольничной пневмонией

А.А.Савченко^{1,2}, Ю.И.Гринштейн², А.С.Дробышева³

- 1 – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"» обособленного подразделения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г;
- 2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;
- 3 – Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 имени И.С.Берзона»: 660123, Красноярск, ул. Инструментальная, 12

Информация об авторах

Савченко Андрей Анатольевич – д. м. н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук"» обособленного подразделения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», заведующий кафедрой физиологии имени профессора А.Т.Пшоника Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (391) 212-52-63; e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Гринштейн Юрий Исаевич – д. м. н., профессор, заведующий кафедрой терапии Института профессионального образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (391) 242-46-64; e-mail: grinstein.yi@mail.ru

Дробышева Анастасия Сергеевна – врач-пульмонолог Краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 имени И.С.Берзона»; тел.: (391) 264-29-80; e-mail: drobysheva.as@mail.ru

Резюме

Целью исследования явился сравнительный анализ зависимости состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови и мокроты у больных пневмонией от уровней активности внутриклеточных ферментов. **Материалы и методы.** Обследованы больные ($n = 82$) внебольничной пневмонией (ВП) средней и тяжелой степени. С помощью хемилюминесцентного анализа определены уровни синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК). С помощью билюминесцентного метода исследованы уровни активности никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) (НАД(Ф))-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах. **Результаты.** Установлено, что у здоровых людей наблюдается низкий уровень респираторного взрыва нейтрофилов крови и его зависимость преимущественно от состояния митохондриального метаболизма и активности малик-фермента. У больных ВП нейтрофилов крови находятся в активированном состоянии, в клетках возрастает активность анаэробного дыхания и метаболизма митохондрий. Дополнительно появляется зависимость уровня респираторного взрыва от активности терминальных реакций гликолиза и ключевой реакции пентозофосфатного цикла. Нейтрофилы мокроты при пневмонии также находятся в активированном состоянии. **Заключение.** Продемонстрировано, что в условиях неблагоприятного окружения наблюдается нарушение механизмов метаболического обеспечения респираторного взрыва, что проявляется в снижении уровня синтеза первичных и вторичных АФК. В клетках возрастает уровень перекисных процессов, выявляется снижение интенсивности терминальных реакций гликолиза и отток субстратов с лимонного цикла на реакции аминокислотного обмена. На этом метаболическом фоне малик-фермент остается единственным стимулирующим респираторный взрыв нейтрофилов мокроты, в то время как отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот ингибируют синтез вторичных АФК.

Ключевые слова: нейтрофилы, пневмония, респираторный взрыв, метаболизм, ферменты.

Для цитирования: Савченко А.А., Гринштейн Ю.И., Дробышева А.С. Особенности метаболического обеспечения респираторного взрыва нейтрофилов крови и мокроты у больных внебольничной пневмонией. *Пульмонология*. 2019; 29 (2): 167–174. DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-2-167-174

Metabolic support of the respiratory burst in blood and sputum neutrophils of patients with community-acquired pneumonia

Andrey A. Savchenko^{1,2}, Yuriy I. Grinshteyn², Anastasiya S. Drobysheva³

- 1 – Krasnoyarsk Federal Research Center of Siberian Department of Russian Academy of Medical Science; Federal Research Institute of Medical Problems of the North, Separate Unit: ul. Partizana Zheleznyaka 3G, Krasnoyarsk, 660022, Russia;
- 2 – V.F.Voyno-Yasenevskiy Krasnoyarsk State Medical University, Healthcare Ministry of Russia: ul. Partizana Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022, Russia;
- 3 – I.S.Berson Krasnoyarsk Territorial Interregional Teaching Hospital No.20: ul. Instrumental'naya 12, Krasnoyarsk, 660123, Russia

Author information

Andrey A. Savchenko, Doctor of Medicine, Professor, Head of Laboratory of Cell Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Federal Research Center of Siberian Department of Russian Academy of Medical Science, Federal Research Institute of Medical Problems of the North, Separate Unit; tel.: (391) 212-52-63; e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Yuriy I. Grinshteyn, Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Therapy, Institute of Postgraduate Medical Training, V.F.Voyno-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Healthcare Ministry of Russia; tel.: (391) 242-46-64; e-mail: grinsteyn.yi@mail.ru
Anastasiya S. Drobysheva, pulmonologist, I.S.Berson Krasnoyarsk Territorial Interregional teaching Hospital No.20; tel.: (391) 264-29-80; e-mail: drobysheva.as@mail.ru

Abstract

The aim of the study was to investigate relationships between the respiratory burst in blood and sputum neutrophils and intracellular enzyme activity in patients with pneumonia. **Methods.** The study involved 82 patients with moderate to severe community-acquired pneumonia (CAP). The chemiluminescent assay was used to investigate synthesis of primary and secondary reactive oxygen species (ROS). The bioluminescent method was used to examine NAD(P)-dependent dehydrogenase activity in neutrophils. **Results.** Low-intensity respiratory burst in blood neutrophils and its predominant relations to the state of mitochondrial metabolism and malic enzyme activity were observed in healthy subjects. Blood neutrophils in patients with CAP were activated; the anaerobic respiration and mitochondrial metabolism increased in the cells. Additionally, intensity of the respiratory burst was related to terminal glycolysis reactions and the key reaction of the pentose phosphate cycle. Sputum neutrophils in patients with CAP were also activated. **Conclusion.** Abnormalities of metabolic support of the respiratory burst, such as decreased production of primary and secondary ROS, could appear under unfavorable conditions. Peroxidation increased in the cells, the intensity of terminal glycolysis reactions decreased, and substrates transferred from the citric acid cycle to amino acid exchange reactions. Under these conditions, malic enzyme remained the only substrate that stimulated the respiratory burst in sputum neutrophils, while substrate transfer from the tricarboxylic acid cycle inhibited synthesis of the secondary ROS.

Key words: neutrophils, pneumonia, respiratory burst, metabolism, enzymes.

For citation: Savchenko A.A., Grinshteyn Yu.I., Drobysheva A.S. Metabolic support of the respiratory burst in blood and sputum neutrophils of patients with community-acquired pneumonia. *Russian Pulmonology*. 2019; 29 (2): 167–174 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2019-29-2-167-174

Пневмония остается одним из самых распространенных заболеваний респираторной системы. Заболеваемость внебольничной пневмонией (ВП) среди лиц молодого и среднего возраста составляет 1–11,6 ‰, увеличиваясь до 25–51 ‰ в старшей возрастной группе [1, 2].

Тяжесть течения и исход заболевания во многом определяются активностью воспалительной реакции организма пациента. Нейтрофилы являются основными эффекторными клетками острого воспаления, готовыми к быстрой активации и миграции в легочную ткань для защиты от различных патогенов. Установлено, что при пневмониях количество нейтрофилов в крови у больных повышается с увеличением величины нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения [3, 4], причем уровень нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения является предиктором исхода заболевания.

Одним из проявлений функциональной активности фагоцитирующих клеток является т. н. респираторный взрыв, который реализуется в синтезе активных форм кислорода (АФК) [5, 6]. Доказано, что фагоцитоз сопровождается реакциями респираторного взрыва [7, 8], при этом активированные нейтрофилы способны выделять АФК и во внеклеточное пространство в процессе механизмов внешнего киллинга. Миграция таких активированных фагоцитов в ткань обуславливает развитие воспаления, что приводит к интенсификации свободнорадикальных процессов и оксидативному стрессу, развитие которых отмечается при различных заболеваниях органов дыхания [9]. Обосновывается зависимость функциональной активности нейтрофилов от состояния их метаболизма [10, 11]. Однако метаболические механизмы, обеспечивающие респираторный взрыв в нейтрофилах в норме и при воспалительных заболеваниях, во многом остаются неизученными.

Целью исследования явился сравнительный анализ зависимости состояния респираторного взрыва

нейтрофилов крови и мокроты у больных пневмонией от уровней активности внутриклеточных ферментов.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты ($n = 82$: 32 женщины и 50 мужчин в возрасте от 18 до 60 лет), находившиеся на лечении в пульмонологическом отделении Краевого государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 имени И.С.Берзона» с диагнозом ВП средней ($n = 45$) и тяжелой ($n = 37$) степени. Поражение легочной ткани при тяжелой пневмонии в 73,5 % случаев было представлено вовлечением 1 доли легкого, в 14,0 % – полисегментарным двусторонним поражением, в 4,8 % – тотальным или субтотальным односторонним поражением легких, в 7,7 % – сегментарным поражением легочной ткани. При пневмонии средней степени тяжести преобладало сегментарное поражение легких (79,7 %), в 1,0 % случаев отмечалось полисегментарное двустороннее поражение легочной ткани и в 19,3 % – доленое поражение. Диагноз пневмония устанавливался согласно Российским национальным рекомендациям по ВП (2010) [12, 13].

Степень тяжести определялась клинико-лабораторными и инструментальными критериями [14], а также по прогностической шкале оценки степени тяжести ВП (*Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood pressure, Age* ≥ 65 – CURB-65) и соответствовала Международной классификации болезней 12-го пересмотра. Пациенты получали парентеральные формы защищенных аминопенициллинов в сочетании с макролидными антибактериальными препаратами внутрь или парентерально.

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и прин-

ципами Хельсинкской декларации (2001). Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации № 77 / 2017 от 26.06.17. До включения в исследование у всех участников получено письменное информированное согласие.

В 1-е сутки госпитализации у больных проводился забор крови для изучения хемилюминесцентной (ХЛ) и метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов. В качестве контроля обследованы здоровые люди ($n = 112$) аналогичного возраста.

Мокрота собиралась в стерильные пластиковые контейнеры, разводилась 1 : 5 физиологическим раствором, содержащим ДНКазу 100 Ед / мл (*SkyGen*, Россия) и гепарин 25 Ед / мл, инкубировалась в течение 30 мин при 37 °С. Пациенты были проинструктированы об определенных правилах сбора мокроты [2]. Нейтрофилы выделялись из цельной гепаринизированной крови и разведенной мокроты центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077$ г / см³ – для отделения лимфоцитов; $\rho = 1,119$ г / см³ – для выделения нейтрофилов. Состояние респираторного взрыва нейтрофилов оценивалось с помощью показателей люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ. Измерение осуществлялось в течение 90 мин на 36-канальном ХЛ-анализаторе СЛ3606 (Россия) [10]. Определялись следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) ХЛ. Усиление зимозан-индуцированной ХЛ оценивалась соотношением площадей индуцированной и спонтанной ХЛ и определялось как индекс активации ($S_{инд.} / S_{спонт.}$). Исследование активности никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) (НАД(Ф))-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах проводилось с помощью биолюминесцентных методов [15]. Метаболизм клеток оценивался по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (НАДФ малатдегидрогеназы (МДГ)), НАД- и никотинамидадениндинуклеотид (НАДН)-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ), НАД- и НАДН-зависимой реакции МДГ, НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (ГДГ), НАД- и НАДН-зависимой ГДГ, НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ выражалась в ферментативных единицах на 10⁴ клеток, где 1 Е = 1 мкмоль / мин*. Исследование проводилось на ферментативном препарате НАД(Ф): FMN-оксидоредуктаза-люцифераза получена из *Photobacterium leiognathi* в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследова-

тельский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук обособленного подразделения «Институт биофизики» Сибирского отделения Российской академии наук (Красноярск). Исследования выполнялись при информированном согласии обследуемых в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2001).

Описание выборки проводилось с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей (C_{25} и C_{75} соответственно). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивалась по U-тесту Манна–Уитни. Различия между показателями связанных выборок определялись согласно парному тесту Уилкоксона. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Статистический анализ осуществлялся в пакете прикладных программ *Statistica 7.0* (*StatSoft Inc.*, 2004).

Результаты и обсуждение

При исследовании люцигенин-зависимой ХЛ нейтрофилов у больных ВП обнаружено, что T_{max} спонтанной ХЛ нейтрофилов как крови, так и мокроты снижено относительно контрольных значений (см. таблицу). При пневмонии I_{max} и S люцигенин-зависимой спонтанной ХЛ нейтрофилов крови повышены относительно контроля и значений нейтрофилов мокроты. Люцигенин-зависимая зимозан-индуцированная ХЛ нейтрофилов крови у больных также характеризуется сниженным T_{max} и повышением I_{max} и S относительно контрольных значений. При этом индекс активации люцигенин-зависимой ХЛ нейтрофилов крови у пациентов с пневмонией снижен. Состояние ХЛ нейтрофилов мокроты при пневмонии характеризуется пониженным I_{max} и уровнем люцигенин-зависимой $S_{инд.}$ и $S_{спонт.}$ ХЛ относительно таковых значений нейтрофилов крови. Показатели I_{max} и люминол-зависимой $S_{спонт.}$ ХЛ нейтрофилов крови у больных повышены относительно контрольных и установленных значений для нейтрофилов мокроты (см. таблицу). Люминол-зависимая зимозан-индуцированная ХЛ нейтрофилов крови у больных характеризуется сниженным T_{max} и повышенными показателями I_{max} и S относительно контрольных значений. В то же время особенности ХЛ нейтрофилов мокроты определяются понижением I_{max} и S относительно таковых показателей крови.

Люцигенин вступает в ХЛ-реакцию только с супероксид-радикалом, который синтезируется НАДФН-оксидазой и относится к первичным АФК [16, 17]. Люминол люминесцирует, вступая в реакцию как с первичными, так и вторичными АФК [7, 18]. В целом уровень респираторного взрыва в нейтрофилах крови у больных пневмонией значительно повышен за счет синтеза как первичных, так и вторичных АФК. Показатель T_{max} характеризует

* Северин Е.С., ред. Биохимия: учебник для вузов. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2004.

Таблица
Хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови и мокроты
у больных внебольничной пневмонией; Me (C₂₅₋₇₅)
Table
Chemiluminescent activity of blood and sputum neutrophils in patients
with community-acquired pneumonia; Me (C₂₅₋₇₅)

Показатели	Контроль (n = 112)		Кровь (n = 82)		Мокрота (n = 82)	
	1		2		3	
	Me	C ₂₅₋₇₅	Me	C ₂₅₋₇₅	Me	C ₂₅₋₇₅
Люцигенин-зависимая спонтанная ХЛ						
T _{max} , с	2 552	1 759–3 547	1 646	1 042–2 210	2 235	543–3 860
			$p_1 < 0,001$		$p_2 = 0,026$	
I _{max} , о. е. × 10 ³	6,79	2,58–14,28	13,91	9,51–40,95	1,20	0,30–4,88
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S, о. е. × с × 10 ⁵	3,05	1,04–9,51	14,71	5,71–25,20	1,18	0,39–4,22
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
Люцигенин-зависимая зимозан-индуцированная ХЛ						
T _{max} , с	2 029	1 618–2 647	1 627	1 128–23 36	1 680	915–2 329
			$p_1 = 0,002$			
I _{max} , о. е. × 10 ³	11,16	7,63–27,68	22,46	10,83–52,98	2,12	0,31–7,61
			$p_1 = 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S, о. е. × с × 10 ⁵	5,65	2,95–15,49	14,42	8,01–32,10	2,22	0,53–5,89
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S _{инд.} / S _{спонт.}	1,77	1,11–3,22	1,09	0,72–2,12	1,32	0,89–1,95
			$p_1 = 0,002$			
Люминол-зависимая спонтанная ХЛ						
T _{max} , с	966	587–1 514	772	434–1 621	441	298–1 656
I _{max} , о. е. × 10 ³	7,98	3,26–21,01	45,18	22,21–82,06	3,57	0,52–28,03
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S, о. е. × с × 10 ⁵	2,66	1,12–7,18	27,71	16,35–48,05	2,32	0,36–15,93
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
Люминол-зависимая зимозан-индуцированная ХЛ						
T _{max} , с	1 098	796–1 463	835	584–1 302	942	521–1 250
			$p_1 = 0,001$			
I _{max} , о. е. × 10 ³	17,48	7,02–34,62	95,47	42,89–127,9	6,84	1,22–35,23
			$p_1 = 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S, о. е. × с × 10 ⁵	5,47	1,97–12,63	53,40	25,90–81,0	4,74	0,95–29,70
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S _{инд.} / S _{спонт.}	1,74	1,34–2,50	1,79	1,19–2,85	1,73	1,14–3,16

Примечание: Me – медиана; C₂₅₋₇₅ – интерквартильный размах в виде 25-го и 75-го перцентилей; T_{max} – время выхода на максимум; I_{max} – максимальное значение интенсивности; ХЛ – хемилюминесценция; S – площадь под кривой ХЛ; S_{инд.} / S_{спонт.} – индекс активации (соотношение площадей индуцированной и спонтанной ХЛ); p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями (U-тест Манна-Уитни); p₂ – статистически значимые различия между ХЛ-показателями нейтрофилов крови и мокроты у больных пневмонией (тест Уилкоксона на соответствие пар).

Notes. p₁, the difference between the study and the control parameters was statistically significant (Mann-Whitney U-test); p₂, the difference between chemiluminescent activity in blood and sputum neutrophils of patients with pneumonia was statistically significant (Wilcoxon's paired test).

скорость развития респираторного взрыва в случае регуляторного или антигенного воздействия на клетку [10], соответственно снижение T_{max} люцигенин-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофилов крови при пневмонии отражает ускорение процесса функциональной активации клеток. В то же время уровень респираторного взрыва (по показателям синтеза первичных и вторичных АФК) нейтрофилов мокроты у больных ВП значительно ниже, чем таковой показатель крови. Следовательно, функциональная активность клеток, выделенных из очага воспаления, значительно снижена, что определяется неблагоприятными условиями окружения и, возможно, истощением метаболических резервов.

При исследовании уровней активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ обнаружено, что активность НАДН ЛДГ в нейтрофилах крови у больных ВП повышена относительно контрольных значений, тогда как в нейтрофилах мокроты активность фермента в 3,9 раза ниже по сравнению с нейтрофилами крови (см. рисунок, А). При пневмонии в нейтрофилах крови активность НАД ГДГ снижена относительно контрольного уровня и значений, выявленных в нейтрофилах мокроты (см. рисунок, В). Только в нейтрофилах крови относительно контрольных значений повышена активность НАДФ МДГ, МДГ и НАДН ГДГ (см. рисунок, С–Е). При пневмонии в нейтрофилах мокроты относительно уровня, выявленного в нейтрофилах крови, повышена активность ГР (см. рисунок, F).

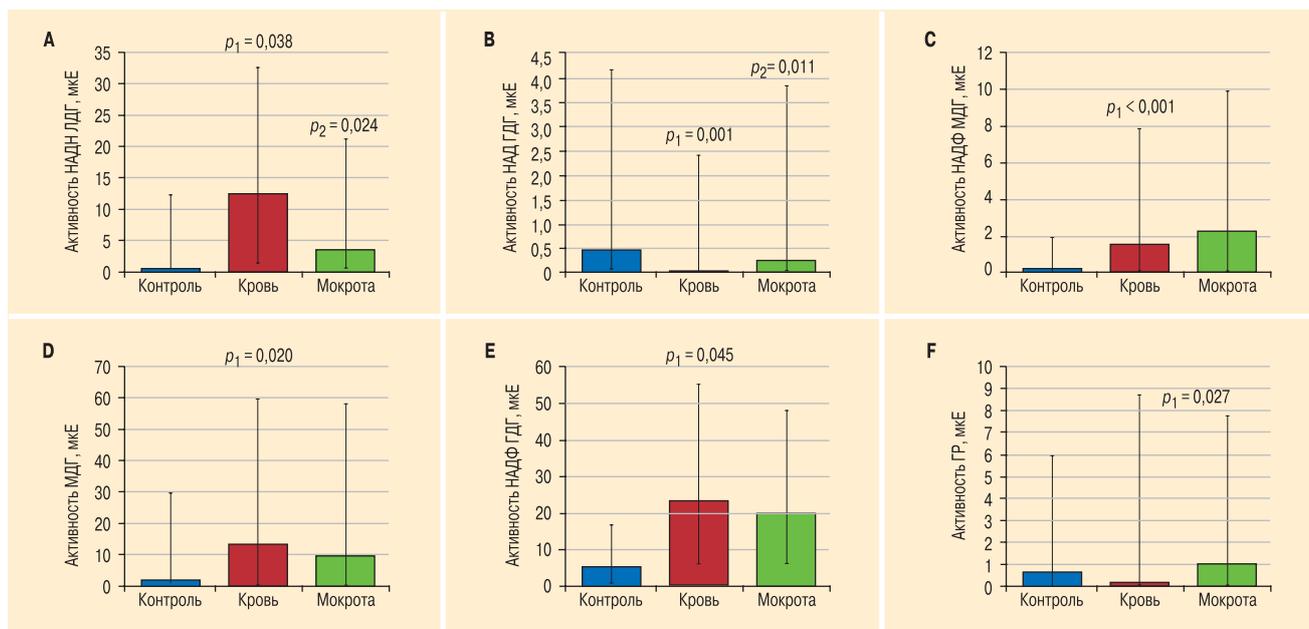


Рисунок. Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови и мокроты у больных внебольничной пневмонией. Примечание: НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ГДГ – глутаматдегидрогеназа; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; МДГ – малатдегидрогеназа; p_1 – статистически значимые различия с контрольными показателями (U-тест Манна–Уитни); p_2 – статистически значимые различия между активностью ферментов нейтрофилов крови и мокроты больных пневмонией (тест Уилкоксона на соответствие пар).

Figure. Activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in blood and sputum neutrophils of patients with community-acquired pneumonia. Notes. NAD(P), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; p_1 , the difference between the study and the control parameters was statistically significant (Mann-Whitney U-test); p_2 , the difference between enzyme activity in blood and sputum neutrophils of patients with pneumonia was statistically significant (Wilcoxon's paired test).

Нейтрофилы являются клетками с преимущественно анаэробной энергетикой, аэробные процессы выполняют вспомогательную роль [19, 20]. Повышенный уровень энергетических процессов в нейтрофилах крови при пневмонии определяется высокой активностью анаэробной реакцией ЛДГ (НАДН ЛДГ) и МДГ, соответственно, данные ферменты характеризуют интенсивность терминальных реакций анаэробного гликолиза и субстратного потока по циклу Кребса*. Стимуляция митохондриальных процессов осуществляется также с помощью активированной НАДФ МДГ. Фермент осуществляет шунтирование медленных реакций лимонного цикла, принимает участие в системе катаболизма ксенобиотиков и является ключевым в реакциях липидного анаболизма* [21]. Кроме того, в нейтрофилах крови больных пневмонией выявляется повышенный отток субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена (через НАДН ГДГ) и снижение поступления интермедиатов на энергетические процессы через НАД ГДГ. Подобное соотношение прямой и обратной реакций ГДГ также характеризует высокую интенсивность митохондриального метаболизма и аэробного дыхания соответственно. В нейтрофилах мокроты при пневмонии по сравнению с нейтрофилами крови выявляется сниженный уровень интенсивности терминальных реакций гликолиза, сопоставимый уровень субстратного потока по циклу Кребса и повышение активности ГР (входит в состав ферментов глутатион-зависимой антиоксидантной системы). Повышение активности ГР отражает активацию перекисных процессов в клетке.

С помощью корреляционного анализа исследована зависимость показателей респираторного взрыва нейтрофилов с уровнями активности внутриклеточных ферментов. Обнаружено, что у лиц контрольной группы в нейтрофилах крови с T_{max} люцигенин-зависимой спонтанной ХЛ положительно взаимосвязаны уровни активности НАДФ ГДГ ($r = 0,46$; $p = 0,034$) и НАДН ЛДГ ($r = 0,47$; $p = 0,030$). Активность МДГ положительно коррелирует с I_{max} люцигенин-зависимой спонтанной и индуцированной ХЛ ($r = 0,58$; $p = 0,006$ и $r = 0,44$; $p = 0,048$ соответственно). В то же время активность ГР отрицательно коррелирует с I_{max} ($r = -0,63$; $p = 0,002$) и S ($r = -0,56$; $p = 0,008$) люцигенин-зависимой $S_{спонт.}$ и $S_{инд.}$ ($r = -0,66$; $p = 0,001$) ХЛ. У лиц контрольной группы в нейтрофилах крови активность МДГ положительно взаимосвязана с I_{max} ($r = 0,38$; $p = 0,004$) и S ($r = 0,50$, $p < 0,001$) люминол-зависимой спонтанной ХЛ, а также с S ($r = 0,33$; $p = 0,014$), индуцированной ХЛ. Активность НАДФ МДГ также положительно коррелирует с I_{max} и люминол-зависимой $S_{спонт.}$ ($r = 0,27$; $p = 0,043$ и $r = 0,35$; $p = 0,008$ соответственно) и зимозан-индуцированной ($r = 0,30$; $p = 0,028$ и $r = 0,40$; $p = 0,003$ соответственно) ХЛ.

В целом можно заключить, что интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови у лиц контрольной группы преимущественно определяется субстратным потоком в цикле трикарбоновых кислот и активностью НАДФ МДГ. Активность ГР оказывает отрицательное влияние на уровень респираторного взрыва, что, по-видимому, определяется ингибированием активности ферментов, синтезирующих АФК, на фоне активации перекисных про-

цессов в клетках. Кинетика респираторного взрыва зависит от внутриклеточной активности НАДФ ГДГ и НАДН ЛДГ. НАДФ ГДГ определяется как вспомогательный фермент цикла Кребса, который осуществляет перенос субстратов с аминокислотного обмена и реакции лимонного цикла*. Анаэробная реакция НАДН ЛДГ интегрально характеризует интенсивность субстратного потока при анаэробном гликолизе. Активность данных ферментов повышается при увеличении энергетических потребностей нейтрофилов, что в состоянии относительного покоя может развиваться при регуляторных воздействиях, соответственно активация анаэробного гликолиза и оттока субстратов на энергетические реакции через НАДФ ГДГ приводит к замедлению скорости развития респираторного взрыва нейтрофилов у лиц контрольной группы.

В нейтрофилах крови у больных пневмонией T_{\max} люцигенин-зависимой спонтанной ХЛ отрицательно коррелирует с активностью НАДФ ГДГ ($r = -0,33$; $p = 0,044$) и НАДН ЛДГ ($r = -0,37$; $p = 0,028$). Необходимо подчеркнуть, что данные взаимосвязи являются противоположными по знаку таковым показателям у лиц контрольной группы. Так же, как и в контроле, при пневмонии обнаружена положительная взаимосвязь активности МДГ с I_{\max} люцигенин-зависимой зимозан-индуцированной ХЛ ($r = 0,37$; $p = 0,026$). С люцигенин-зависимой $S_{\text{инд}}$ ХЛ нейтрофилов крови положительно взаимосвязаны активности Г6ФДГ ($r = 0,34$; $p = 0,042$), НАДФ ГДГ ($r = 0,39$; $p = 0,018$) и НАДН ЛДГ ($r = 0,36$; $p = 0,029$). Активность МДГ положительно взаимосвязана с I_{\max} и люминол-зависимой $S_{\text{спонт}}$ ($r = 0,40$; $p = 0,003$ и $r = 0,44$; $p = 0,042$ соответственно) и I_{\max} индуцированной ($r = 0,30$; $p = 0,031$) ХЛ. Также обнаружена положительная корреляционная связь между активностью Г6ФДГ и люминол-зависимой $S_{\text{инд}}$ ХЛ ($r = 0,31$; $p = 0,022$).

Интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных ВП также зависит от субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот. Дополнительный вклад в стимуляцию ферментов, синтезирующих АФК, вносят Г6ФДГ, НАДФ ГДГ и НАДН ЛДГ. В связи с этим повышение интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных ВП осуществляется за счет реакций энергетического (анаэробного и аэробного) и пластического (пентозофосфатный цикл) обмена. Необходимо отметить, что взаимосвязь между уровнями активности НАДФН-оксидазы и Г6ФДГ характеризуется именно при выраженной индукции синтеза клетками супероксид-радикала [22]. Особенностью взаимосвязей между показателями респираторного взрыва нейтрофилов крови и активностью НАДФ-зависимых дегидрогеназ при пневмонии является инверсия знака корреляции (по сравнению с выявленным у лиц контрольной группы) между T_{\max} люцигенин-зависимой спонтанной ХЛ и уровнями активности НАДФ ГДГ и НАДН ЛДГ. В связи с тем, что функциональная активность нейтрофилов крови у больных ВП повышена, можно заключить, что

активация анаэробного гликолиза и субстратная стимуляция цикла трикарбоновых кислот положительно стимулирует уровень синтеза первичных АФК.

В нейтрофилах мокроты у больных пневмонией выявляется наименьшее количество корреляционных связей между параметрами их респираторного взрыва и активностью ферментов. Обнаружено, что активность НАДФ МДГ положительно коррелирует с I_{\max} люцигенин-зависимой спонтанной ($r = 0,37$; $p = 0,030$) и зимозан-индуцированной ($r = 0,44$; $p = 0,011$) ХЛ. При этом активность НАДФН ГДГ отрицательно взаимосвязана с люминол-зависимой $S_{\text{спонт}}$ ($r = -0,30$; $p = 0,042$) и зимозан-индуцированной ($r = -0,31$; $p = 0,034$) ХЛ. В целом интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов мокроты у больных ВП зависит только от активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ. При этом НАДФ МДГ, осуществляя стимуляцию реакций липидного анаболизма, стимулирует синтез первичных АФК, тогда как отток субстратов с реакций трикарбоновых кислот через НАДФ-зависимую ГДГ ингибирует синтез АФК всех типов.

Заключение

Исходя из результатов ХЛ- и биолюминесцентного анализа, а также результатов корреляционного анализа, можно предположить следующие механизмы метаболического обеспечения респираторного взрыва нейтрофилов: у здоровых людей нейтрофильные гранулоциты крови находятся в состоянии относительного покоя, что определяется низким уровнем респираторного взрыва и его зависимостью преимущественно от состояния митохондриального метаболизма и активности малик-фермента. При данном функциональном состоянии уровень внутриклеточных перекисных процессов оказывает отрицательное влияние на синтез первичных АФК. При пневмонии нейтрофилы крови находятся в активированном состоянии, что характеризуется высокой интенсивностью респираторного взрыва (по уровню синтеза первичных и вторичных АФК). В клетках возрастает активность анаэробного дыхания и метаболизма митохондрий. Дополнительно появляется зависимость уровня респираторного взрыва от активности терминальных реакций гликолиза и ключевой реакции пентозофосфатного цикла (Г6ФДГ). Выявляется инверсия корреляционной зависимости кинетики синтеза первичных АФК от активности ферментов, что определяет наличие дисбаланса между метаболическими реакциями и синтезом АФК. Нейтрофилы мокроты при пневмонии также находятся в активированном состоянии. Однако в условиях неблагоприятного окружения (наличие воздушных поллютантов; другое, по сравнению с кровью и тканью, соотношение парциального давления кислорода и углекислого газа; большое количество воспалительных медиаторов) наблюдается нарушение механизмов метаболического обеспечения респираторного взрыва, что проявляется в снижении уровня синтеза первичных и вторичных АФК.

В клетках возрастает уровень перекисных процессов, выявляется снижение интенсивности терминальных реакций гликолиза и отток субстратов с лимонного цикла на реакции аминокислотного обмена. На этом метаболическом фоне малик-фермент остается единственным, стимулирующим респираторный взрыв нейтрофилов мокроты, в то время как отток субстратов с цикла Кребса ингибирует синтез вторичных АФК. Установленные механизмы зависимости респираторного взрыва нейтрофилов от состояния их обменных процессов дают надежду на возможность разработки методов метаболической регуляции функциональной активности фагоцитирующих клеток.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует. Исследование проводилось без участия спонсоров.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest. The study was not supported.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ВП – внебольничная пневмония

ГЗФДГ – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГДГ – глутаматдегидрогеназа

ГР – глутатионредуктаза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МДГ – малатдегидрогеназа

Me – медиана

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид
восстановленный

НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотид
(фосфат)

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
восстановленный

ХЛ – хемилюминесценция

C_{25-75} – интерквартильный размах в виде 25-го
и 75-го процентилей

CURB-65 (*Confusion, Urea, Respiratory rate, Blood
pressure, Age* ≥ 65) – шкала оценки степени
тяжести внебольничной пневмонии

I_{\max} – максимальное значение интенсивности
хемилюминесценции

T_{\max} – время выхода на максимум хемилюминес-
ценции

S – площадь под кривой хемилюминесценции

$S_{\text{инд.}} / S_{\text{спонт.}}$ – индекс активации (соотношение
площадей индуцированной и спонтанной
хемилюминесценции)

Литература

1. Колосов В.П., Кочегарова Е.Ю., Нарышкина С.В. Внебольничная пневмония (клиническое течение, прогнозирование исходов). Благовещенск: АГМА; 2012.
2. Чучалин А.Г., ред. Пульмонология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
3. Cataudella E., Giraffa C.M., Di Marca S. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: an emerging marker predicting prognosis in elderly adults with community-acquired pneumonia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017; 65 (8): 1796–1801. DOI: 10.1111/jgs.14894.
4. Kartal O., Kartal A.T. Value of neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios in pneumonia. *Bratisl. Lek. Listy.* 2017; 118 (9): 513–516. DOI: 10.4149/BLL_2017_099.
5. Parenti A., Indorato B., Paccosi S. Minocycline affects human neutrophil respiratory burst and transendothelial migration. *Inflamm. Res.* 2017; 66 (2): 107–109. DOI: 10.1007/s00011-016-0999-x.
6. Stålhammar M.E., Douhan Håkansson L., Sindelar R. Bacterial N-formyl peptides reduce PMA- and Escherichia coli-induced neutrophil respiratory burst in term neonates and adults. *Scand. J. Immunol.* 2017; 85 (5): 365–371. DOI: 10.1111/sji.12537.
7. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии.* 2009; 49: 341–388.
8. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 2004; 40: 845–859. DOI: 10.1016/j.molimm.2003.10.005.
9. Соодаева С.К., Климанов И.А., Никитина Л.Ю. Нитрозивный и оксидативный стресс при заболеваниях органов дыхания. *Пульмонология.* 2017; 27 (2): 262–273. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273.
10. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания. *Вестник РАМН.* 2014; 69 (5–6): 23–28. DOI: 10.15690/vramn.v69i5-6.1039.
11. Walmsley S.R., Whyte M.K. Neutrophil energetics and oxygen sensing. *Blood.* 2014; 123 (18): 2753–2754. DOI: 10.1182/blood-2014-03-560409.
12. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Российское респираторное общество (РРО) Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Пульмонология.* 2014; (4): 13–48. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-4-13-48.
13. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия.* 2015; 17 (2): 84–126.
14. Дворецкий Л.И. Внебольничная пневмония: взгляд терапевта. *Consilium Medicum.* 2008; 10 (3): 34–40.
15. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 159 (5) 656–660. DOI: 10.1007/s10517-015-3049-8.
16. Nguyen G.T., Green E.R., Mecasas J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7: 373. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373.
17. Zhang L., Wu J., Duan X. et al. NADPH oxidase: A potential target for treatment of stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 5026984. DOI: 10.1155/2016/5026984.
18. Kószegi T., Sali N., Raknić M. et al. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2017; 88 (Pt 2): 153–159. DOI: 10.1016/j.vascn.2017.09.256.
19. Bao Y., Ledderose C., Graf A.F. et al. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil

- chemotaxis. *J. Cell Biol.* 2015; 210 (7): 1153–1164. DOI: 10.1083/jcb.201503066.
20. Milot E., Filep J.G. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *Sci. World J.* 2011; 11: 1948–1962. DOI: 10.1100/2011/131539.
21. Lu L., Wang M., Liao X. et al. Manganese influences the expression of fatty acid synthase and malic enzyme in cultured primary chicken hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 2017; 118 (11): 881–888. DOI: 10.1017/S0007114517002987.
22. Cai T., Kuang Y., Zhang C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *Am. J. Cancer Res.* 2015; 5 (5): 1610–1620.
- according to outcomes]. *Vestnik RAMN.* 2014; 69 (5-6): 23–28. DOI: 10.15690/vramn.v69i5-6.1039 (in Russian).
11. Walmsley S.R., Whyte M.K. Neutrophil energetics and oxygen sensing. *Blood.* 2014; 123 (18): 2753–2754. DOI: 10.1182/blood-2014-03-560409.
12. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. et al. [Russian Respiratory Society, Interregional Association on Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. Clinical Guidelines on Diagnosis, Treatment and Prevention of Severe Community-Acquired Pneumonia in Adults]. *Pul'monologiya.* 2014; (4): 13–48. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-4-13-48 (in Russian).
13. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. et al. [Clinical Guidelines on Diagnosis, Treatment and Prevention of Severe Community-Acquired Pneumonia in Adults]. *Klinicheskaya mikrobiologiya antimikrobnaya khimioterapiya.* 2015; 17 (2): 84–126 (in Russian).
14. Dvoretzkiy L.I. [Community-acquired pneumonia, therapist's point of view]. *Consilium Medicum.* 2008; 10 (3): 34–40 (in Russian).
15. Savchenko A.A. [Measurement of activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in neutrophilic granulocytes using the bioluminescent method]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2015; 159 (5): 656–660. DOI: 10.1007/s10517-015-3049-8 (in Russian).
16. Nguyen G.T., Green E.R., Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7: 373. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373.
17. Zhang L., Wu J., Duan X. et al. NADPH oxidase: A potential target for treatment of stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016; 2016: 5026984. DOI: 10.1155/2016/5026984.
18. Kőszegi T., Sali N., Raknić M. et al. A novel luminol-based enhanced chemiluminescence antioxidant capacity microplate assay for use in different biological matrices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2017; 88 (Pt 2): 153–159. DOI: 10.1016/j.vascn.2017.09.256.
19. Bao Y., Ledderose C., Graf A.F. et al. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* 2015; 210 (7): 1153–1164. DOI: 10.1083/jcb.201503066.
20. Milot E., Filep J.G. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *Sci. World J.* 2011; 11: 1948–1962. DOI: 10.1100/2011/131539.
21. Lu L., Wang M., Liao X. et al. Manganese influences the expression of fatty acid synthase and malic enzyme in cultured primary chicken hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 2017; 118 (11): 881–888. DOI: 10.1017/S0007114517002987.
22. Cai T., Kuang Y., Zhang C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *Am. J. Cancer Res.* 2015; 5 (5): 1610–1620.

Поступила 10.01.18

References

- Kolosov V.P., Kochegarova E.Yu., Naryshkina S.V. [Community-Acquired Pneumonia: clinical course, prediction of outcomes]. Blagoveshchensk: AGMA; 2012 (in Russian).
- Chuchalin A.G., ed. [Pulmonology. A National Manual]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016 (in Russian).
- Cataudella E., Giraffa C.M., Di Marca S. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: an emerging marker predicting prognosis in elderly adults with community-acquired pneumonia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017; 65 (8): 1796–1801. DOI: 10.1111/jgs.14894.
- Kartal O., Kartal A.T. Value of neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios in pneumonia. *Bratisl. Lek. Listy.* 2017; 118 (9): 513–516. DOI: 10.4149/BLL_2017_099.
- Parenti A., Indorato B., Paccosi S. Minocycline affects human neutrophil respiratory burst and transendothelial migration. *Inflamm. Res.* 2017; 66 (2): 107–109. DOI: 10.1007/s00011-016-0999-x.
- Stålhammar M.E., Douhan Håkansson L., Sindelar R. Bacterial N-formyl peptides reduce PMA- and Escherichia coli-induced neutrophil respiratory burst in term neonates and adults. *Scand. J. Immunol.* 2017; 85 (5): 365–371. DOI: 10.1111/sji.12537.
- Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. [Free radicals and cell chemiluminescence]. *Uspekhi biologicheskoy khimii.* 2009; 49: 341–388 (in Russian).
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 2004; 40: 845–859. DOI: 10.1016/j.molimm.2003.10.005.
- Soodaeva S.K., Klimanov I.A., Nikitina L.Yu. [Nitrosative and oxidative stresses in respiratory diseases]. *Pul'monologiya.* 2017; 27 (2): 262–273. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-262-273 (in Russian).
- Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. [Chemiluminescent and enzymatic activity of neutrophils in patients with extended purulent peritonitis

Received January 10, 2018