

ЗАВИСИМОСТЬ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ ОТ СОСТОЯНИЯ ИХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ЭНДОМЕТРИТАМИ И АДНЕКСИТАМИ

© 2018 г. А. А. Савченко, Э. В. Каспаров, С. С. Арутюнян, А. Г. Борисов, И. И. Гвоздев

ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»,
обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия

Поступила: 08.05.2018. Принята: 20.06.2018

Целью работы явилось изучение зависимости респираторного взрыва нейтрофилов от активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ у больных хроническими эндометритами и аднекситами. Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста с хроническим эндометритом и аднекситом. В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возраста. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах проводили с помощью биолюминесцентного метода. При хроническом эндометрите обнаружена высокая интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов, которая определяется повышением уровня синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК). У больных хроническим аднекситом респираторный взрыв нейтрофилов реализуется при дисбалансе синтеза первичных и вторичных АФК: при сниженной активности NADPH-оксидазы наблюдается высокий уровень синтеза вторичных АФК. Метаболизм нейтрофилов у женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза характеризуется высоким уровнем липидного обмена и NAD-зависимого субстратного потока между реакциями цикла трикарбоновых кислот и аминокислотного обмена. Особенностью метаболизма нейтрофилов при хроническом эндометрите является высокая активность малатдегидрогеназы. Характерными особенностями метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим аднекситом являются снижение интенсивности анаэробного гликолиза и NADP-зависимого субстратного обмена между реакциями цикла трикарбоновых кислот и аминокислотного обмена. При хроническом эндометрите взаимосвязи между показателями респираторного взрыва и метаболизма нейтрофилов отражают ингибирующее влияние анаэробной реакции лактатдегидрогеназы на индуцированный синтез первичных АФК. У женщин с хроническим аднекситом респираторный взрыв нейтрофилов зависит от активности NADP-зависимых дегидрогеназ, но при выраженном влиянии ферментов энергетического профиля. Также характерной особенностью при хроническом аднексите является стимулирующее влияние на синтез первичных АФК активности глутатионредуктазы. Определение механизмов метаболической регуляции респираторного взрыва нейтрофилов позволяет охарактеризовать регуляторные аспекты иммунопатогенеза инфекционно-воспалительных заболеваний и может явиться основой для разработки новых методов иммунометаболической терапии.

Ключевые слова: хронический эндометрит, хронический аднексит, нейтрофилы, респираторный взрыв, метаболизм, активность дегидрогеназ

DOI: 10.31857/S102872210002420-7

Адрес: 660022 Красноярск, НИИ медицинских проблем Севера, Савченко Андрей Анатольевич.

Тел.: +79059713715, E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Авторы:

Савченко А. А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

Каспаров Э. В., д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

Арутюнян С. С., врач гинекологического отделения НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Россия;

Борисов А. Г., к.м.н., в.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

Гвоздев И. И., м.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре гинекологических инфекционно-воспалительных заболеваний лидирующее положение занимает острый и хронический эндометрит и аднексит [1, 2]. Они так же являются наиболее частой причиной тяжелых осложнений, таких как сепсис, перитонит, спаечный процесс, бесплодие, невынашивание беременности и хроническая тазовая боль. В основе этиопатогенеза эндометритов и аднексита лежит инфекционный процесс, развивающийся в результате восходящей инфекции из цервикального канала и вызывающий развитие иммуновоспалительной реакции [3, 4].

Ключевую роль в развитии воспалительных процессов играют нейтрофильные гранулоциты. Нейтрофилы быстро мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [5, 6, 7, 8]. Обладая широким набором рецепторов, нейтрофилы очень чувствительны к окружающей среде и при малейшем нарушении гомеостаза модулируют свои функции, направленные на его восстановление. Одним из важных аспектов проявления функциональной активности нейтрофилов является респираторный взрыв, развивающийся при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза, интенсивность которого формируется синтезом активных форм кислорода (АФК) [9, 10, 11]. Обсуждается роль респираторного взрыва фагоцитирующих клеток в реализации ими функции внешнего киллинга [12, 13]. При этом не вызывает сомнения, что реализация нейтрофилами своих функциональных возможностей в значительной мере зависит от характера течения в них метаболических процессов [5, 14, 15]. Все модуляторы функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, прежде всего, изменяют метаболизм клеток, переключая субстратный поток с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетику клетки и синтетические процессы. Особенно высокой информативностью для исследования метаболизма клеток иммунной системы обладают NAD- и NADP-зависимые дегидрогеназы. Это связано с тем, что, являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и координируют сопряженные метаболические пути [5].

В связи с этим, целью исследования явилось изучение зависимости респираторного взрыва нейтрофилов от активности NAD(P)-зависимых

дегидрогеназ у больных хроническими эндометритами и аднекситами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет) с хроническим эндометритом (48 чел.) и аднекситом (41 чел.). Диагноз ставился при проведении комплексного обследования, которое включало расширенную кольпоскопию, цитологические и морфологические методы. В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона.

Нейтрофилы выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографины: $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения лимфоцитов; $\rho=1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофилов. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [10]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Сспонт.).

Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах проводили с помощью биолюминесцентного метода [14]. Метаболизм клеток оценивали по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), малик-фермента (NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой реакции глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность деги-

дрогеназ выражали в ферментативных единицах на 104 клеток, где 1 Е=1 мкмоль/мин.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75} , соответственно). Достоверность различий между показателями оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании активности и кинетики люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у больных хроническим эндометритом и аднекситом сокращается время выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции кле-

ток (табл. 1). Однако время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при хроническом аднексите снижается более выражено, чем при хроническом эндометрите. Только у больных хроническим эндометритом относительно контрольных значений и выявленных у пациенток с хроническим аднекситом обнаружено повышение максимума интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Причем, увеличение площади под кривой индуцированной хемилюминесценции при эндометрите относительно контрольного уровня менее выражено, чем повышение площади под кривой спонтанной хемилюминесценции, что выражается в снижении величины индекса активации нейтрофилов по люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

В то же время, у больных хроническим аднекситом наблюдается понижение площади под кривой спонтанной люцигенин-зависимой хе-

Таблица 1. Люцигенин-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим эндометритом и хроническим аднекситом (Me, C_{25} – C_{75})

Показатели	Контроль n=98 1		Эндометрит n=48 2		Аднексит n=41 3	
	Me	C_{25} – C_{75}	Me	C_{25} – C_{75}	Me	C_{25} – C_{75}
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	2093	1425–2881	1456	1169–1788	1174	1083–1512
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,038$	
Imax, о.е. $\times 10^3$	7,74	2,61–16,54	21,12	9,42–38,99	6,90	1,77–16,23
			$p_1 < 0,001$		$p_2 < 0,001$	
S, о.е. \times сек. $\times 10^7$	1,52	0,40–4,11	3,70	1,64–6,29	0,85	0,23–1,82
			$p_1 = 0,001$		$p_1 = 0,022$ $p_2 < 0,001$	
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1738	1389–2331	1370	1190–1556	1195	1028–1552
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
Imax, о.е. $\times 10^3$	14,14	7,59–28,96	29,39	17,35–47,53	8,34	3,66–23,47
			$p_1 < 0,001$		$p_1 = 0,034$ $p_2 < 0,001$	
S, о.е. \times сек. $\times 10^7$	2,52	1,07–6,46	4,50	2,68–7,02	0,98	0,41–2,79
			$p_1 = 0,041$		$p_1 = 0,001$ $p_2 < 0,001$	
Синд./ Спонт.	1,77	1,17–3,11	1,48	1,07–1,97	1,57	1,17–1,97
			$p_1 = 0,017$			

Примечание: p_1 – статистически значимые различия с контрольными показателями; p_2 – -//- с показателями больных эндометритами.

Таблица 2. Люминол-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим эндометритом и хроническим аднекситом (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль n=98 1		Эндометрит n=48 2		Аднексит n=41 3	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	969	567–1559	1216	322–1657	246	171–866
					p _{1,2} <0,001	
Imax, о.е. × 10 ³	10,83	4,06–30,88	67,08	22,11–86,83	44,41	11,92–83,87
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
S, о.е.× сек. × 10 ⁷	1,49	0,45–5,09	11,10	3,79–15,16	4,39	1,09–9,32
			p ₁ <0,001		p ₁ =0,018 p ₂ =0,008	
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1072	796–1459	1116	521–1700	815	213–1088
					p _{1,2} <0,001	
Imax, о.е. × 10 ³	21,25	7,55–62,59	103,14	42,68–128,37	47,22	16,04–116,16
			p ₁ <0,001		p ₁ =0,020	
S, о.е.× сек. × 10 ⁷	2,43	0,92–8,42	17,92	9,41–22,27	6,46	2,66–16,76
			p ₁ <0,001		p ₁ =0,024 p ₂ =0,003	
Синд./ Спонт.	1,89	1,34–2,87	1,61	1,27–2,14	1,69	1,28–2,57

Примечание: p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- с показателями больных эндометритами.

милюминесценции нейтрофилов относительно контрольного диапазона и значений, выявленных у пациентов с хроническим эндометритом, а также снижение максимума интенсивности и площади под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции также контрольных значений и выявленных при хроническом эндометрите.

При исследовании люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови обнаружено, что у больных хроническим эндометритом повышен максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции относительно контрольных значений (табл. 2). У больных хроническим аднекситом установлено уменьшение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной хемилюминесценции относительно контрольных значений и выявленных у пациентов с хроническим эндометритом. При хроническом аднексите также повышается максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов относительно контроль-

ных значений. Однако площадь под кривой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при хроническом аднексите ниже, чем при хроническом эндометрите.

Исследование активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови позволило установить, что только у больных хроническим эндометритом относительно контрольных значений повышается активность МДГ (табл. 3). Только у больных хроническим аднекситом в нейтрофилах относительно контрольного диапазона и значений, выявленных у больных хроническим эндометритом, снижается активность ЛДГ, NADP-ИЦДГ, NADH-ЛДГ, NADH-МДГ и NADPH-ГДГ. Независимо от инфекционно-воспалительного заболевания органов малого таза в нейтрофилах крови повышается активность ГбФДГ, NADP-МДГ, NAD-ГДГ и NADH-ГДГ.

С помощью корреляционного анализа исследованы особенности взаимосвязи между показателями респираторного взрыва нейтрофилов и уровнями активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Обнаружено, что у лиц контроль-

Таблица 3. Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах у больных хроническим эндометритом и хроническим аднекситом (Ме C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль n=98 1		Эндометрит n=48 2		Аднексит n=41 3	
	Ме	C ₂₅ –C ₇₅	Ме	C ₂₅ –C ₇₅	Ме	C ₂₅ –C ₇₅
Г6ФДГ	0,89	0,01–4,18	0,32	0,01–6,14	0,71	0,08–1,08
ГЗФДГ	0,32	0,01–1,72	4,43	1,09–12,20	5,57	1,93–16,00
ЛДГ	10,90	0,89–30,65	15,52	8,98–44,07	5,78	3,38–11,22
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
NADP-МДГ	0,03	0,01–0,86	0,48	0,01–2,58	1,18	0,03–4,48
			p ₁ =0,048		p ₁ =0,020	
NADP-ГДГ	0,16	0,01–1,31	0,11	0,01–0,19	0,12	0,01–0,42
NADP-ИЦДГ	1,35	0,01–5,88	0,62	0,18–3,56	0,15	0,05–0,31
					p ₁ =0,022 p ₂ =0,025	
МДГ	1,95	0,01–11,80	30,12	7,33–50,67	6,53	0,21–15,18
			p ₁ =0,007			
NAD-ГДГ	0,67	0,01–4,60	9,06	2,45–58,07	9,41	3,13–11,19
			p ₁ <0,001		p ₁ <0,001	
NAD-ИЦДГ	0,01	0,01–0,65	0,06	0,01–0,96	0,01	0,01–0,05
NADH-ЛДГ	2,39	0,04–18,88	5,10	0,11–20,89	0,33	0,01–2,03
					p ₁ =0,041 p ₂ =0,008	
NADH-МДГ	15,80	3,67–35,78	30,11	24,27–63,55	3,70	0,08–25,29
					p ₁ =0,028 p ₂ =0,006	
ГР	1,14	0,01–3,68	0,98	0,01–4,84	1,26	0,01–3,87
NADH-ГДГ	5,98	0,11–12,39	24,77	5,32–48,18	16,56	1,00–37,23
			p ₁ =0,024		p ₁ =0,040	
NADPH-ГДГ	12,48	0,14–31,40	20,22	3,26–38,83	2,35	0,02–6,47
					p ₁ =0,034 p ₂ =0,005	

Примечание: p₁ – статистически значимые различия с контрольными показателями; p₂ – -//- с показателями больных эндометритами.

ной группы максимум интенсивности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции положительно коррелирует с активностью NADP-ИЦДГ ($r=0,53$, $p=0,022$) и отрицательно – с ГР ($r=-0,56$, $p=0,015$). Площадь под кривой спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции положительно взаимосвязана с активностью NADP-МДГ ($r=0,50$, $p=0,035$) и отрицательно – с активностью ГР ($r=-0,52$, $p=0,026$). Активность ГР также отрицатель-

но коррелирует с максимумом интенсивности и площади под кривой зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r=-0,69$, $p=0,002$ и $r=-0,61$, $p=0,007$, соответственно). Активность Г6ФДГ положительно взаимосвязана с максимумом интенсивности спонтанной и индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r=0,27$, $p=0,026$ и $r=0,32$, $p=0,007$, соответственно), в то время как активность NADP-МДГ так-

же положительно коррелирует с максимумами интенсивности и площадью под кривой спонтанной ($r=0,34$, $p=0,003$ и $r=0,25$, $p=0,037$, соответственно) и зимозан-индуцированной ($r=0,30$, $p=0,013$ и $r=0,26$, $p=0,031$, соответственно) люминол-зависимой хемилюминесценции. Кроме того, у лиц контрольной группы с временем выхода на максимум индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции положительно коррелирует активность ГЗФДГ ($r=0,32$, $p=0,007$) и МДГ ($r=0,25$, $p=0,040$), тогда как с индексом активации взаимосвязана активность NADP-ИЦДГ ($r=0,41$, $p<0,001$).

У больных хроническим эндометритом время выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно взаимосвязано соответственно с уровнями активности NADP-ГДГ ($r=0,60$, $p=0,023$) и ГЗФДГ ($r=0,53$, $p=0,049$). С индексом активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов отрицательно взаимосвязана активность NADH-ЛДГ ($r=-0,59$, $p=0,026$). В то же время с индексом активации люминол-зависимой хемилюминесценции положительно коррелирует активность NAD-ИЦДГ ($r=0,55$, $p=0,044$).

У больных хроническим аднекситом активность МДГ нейтрофилов положительно коррелирует с временем выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r=0,51$, $p=0,035$). Активность ГР положительно коррелирует с максимумами интенсивности и площадью под кривой спонтанной ($r=0,53$, $p=0,027$ и $r=0,59$, $p=0,013$, соответственно) и индуцированной ($r=0,54$, $p=0,024$ и $r=0,49$, $p=0,047$, соответственно) люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Активность Г6ФДГ нейтрофилов у больных данной группы положительно коррелирует с площадью под кривой индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции и индексом активации ($r=0,51$, $p=0,030$ и $r=0,56$, $p=0,016$, соответственно). При этом максимум интенсивности индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции отрицательно взаимосвязан с активностью ЛДГ нейтрофилов ($r=-0,48$, $p=0,046$). Также у женщин данной группы выявляются многочисленные взаимосвязи активности ферментов с показателями люминол-зависимой хемилюминесценции: NADP-ГДГ с временем выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции ($r=0,70$, $p=0,001$) и индексом активации ($r=0,54$, $p=0,022$), NADP-МДГ с площадью

под кривой спонтанной хемилюминесценции ($r=0,51$, $p=0,031$), ГР с площадью под кривой спонтанной ($r=0,58$, $p=0,014$) и индуцированной ($r=0,68$, $p=0,003$) хемилюминесценции, Г6ФДГ с индексом активации ($r=0,56$, $p=0,012$) и NADH-МДГ с максимумом интенсивности индуцированной хемилюминесценции ($r=0,58$, $p=0,014$). Кроме того, при хроническом аднексите выявляются положительные взаимосвязи времени выхода на максимум индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции с активностью ГЗФДГ ($r=0,59$, $p=0,010$) и МДГ ($r=0,76$, $p<0,001$) нейтрофилов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние респираторного взрыва нейтрофилов определяется уровнями синтеза первичных и вторичных АФК и опосредует процессы фагоцитоза и киллинга [5, 10, 16]. Интенсивность респираторного взрыва было исследовано с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе NADPH-оксидазы [9, 10, 17]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве. Обнаружено, что уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами крови в группах обследуемых больных значительно различается. Так, у больных хроническим эндометритом установлено повышение активности NADPH-оксидазы в нейтрофилах, находящихся в состоянии относительного покоя (спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция) и при дополнительной антигенной индукции респираторного взрыва (зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция). Однако повышение интенсивности синтеза супероксид-радикала нейтрофилами при дополнительной антигенной индукции у пациентов данной группы относительно контрольных значений менее выражено, чем для клеток, находящихся в состоянии относительного покоя, что определяется снижением величины индекса активации (Синд./Спонт.). Индекс активации характеризует уровень метаболических резервов клеток, необходимых для реализации респираторного взрыва при дополнительной антигенной индукции [5]. Соответственно, можно заключить, что у больных хроническим эндометритом наблюдается истощение метаболических резер-

вов для активации NADPH-оксидазы в активированных нейтрофилах крови. Кроме того, у больных хроническим эндометритом выявляется сокращение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Данный показатель характеризует скорость развития респираторного взрыва от момента регуляторного или антигенного воздействия на клетку до максимальной активации ферментов, синтезирующих АФК [9].

В то же время, у больных хроническим аднекситом обнаружено снижение активности NADPH-оксидазы (как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных у пациентов с хроническим эндометритом) в нейтрофилах крови, находящихся в состоянии относительного покоя и при дополнительной антигенной стимуляции. Выявляется сокращение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Следовательно, при хроническом аднексите выявляется истощение метаболических резервов для активации NADPH-оксидазы, что проявляется в снижении интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции и сокращении времени ее выхода на максимум.

Формирование пула вторичных АФК в нейтрофилах осуществляется целым комплексом ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, миелопероксидазы и др. [5, 18]. Для оценки интенсивности синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови нами использовалась люминол-зависимая хемилюминесценция. Люминол также способен проходить через клеточные мембраны и вступать в хемилюминесцентную реакцию, как с первичными, так и вторичными АФК внутри клетки [5, 19]. Обнаружено, что у больных хроническими эндометритом и аднекситом в нейтрофилах крови повышен уровень синтеза вторичных АФК, как для клеток, находящихся в состоянии относительного покоя, так и при дополнительной антигенной индукции респираторного взрыва. Однако при хроническом аднексите выявляется менее выраженное относительно контрольного диапазона увеличение интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции по сравнению с выявленным при хроническом эндометрите. У пациентов с хроническим аднекситом наблюдается сокращение времени выхода на максимум люминол-зависимой хемилюминесценции.

Интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов не может не определяться состояни-

ем их метаболических процессов. Известно, что активность НАДФН-оксидазы зависит от метаболизма глюкозы в клетках и интенсивности субстратного потока по пентозофосфатному циклу [20, 21]. Исследуемые ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы и тем самым, определяя функциональные возможности нейтрофилов. Так, ГЗФДГ осуществляет перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [22]. Повышение активности данного фермента в нейтрофилах с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза отражает субстратную стимуляцию гликолиза. Между тем, активность анаэробной реакции ЛДГ (NADH-ЛДГ), характеризующей уровень терминального этапа анаэробного гликолиза, у больных женщин в нейтрофилах крови не повышается. Более того, при хроническом аднексите наблюдается снижение активности анаэробной реакции ЛДГ, на основании чего можно предположить ингибирование анаэробного дыхания клеток. Общим для инфекционно-воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин является повышение в нейтрофилах активности NADP-МДГ. Малик-фермент принимает активное участие в системе катаболизма ксенобиотиков и является ключевым в анаболизме липидов [23]. В целом, высокая активность ГЗФДГ и NADP-МДГ отражают повышенный уровень липидного обмена в нейтрофилах крови у больных хроническими эндометритом и аднекситом.

Нейтрофилы являются клетками, осуществляющими свою функцию преимущественно в анаэробных условиях. Однако их метаболизм также зависит от состояния обменных процессов в митохондриях [5, 24]. Нами исследована активность двух ферментов цикла трикарбоновых кислот — NAD-ИЦДГ и МДГ. Обнаружено, что у больных хроническим эндометритом в нейтрофилах крови активность МДГ повышена, что характеризует высокий уровень интенсивности субстратного потока по циклу Кребса. У больных с хроническим аднекситом подобных изменений не выявлено. Более того, у женщин данной группы в нейтрофилах снижается активность ключевой реакции малат-аспартатного шунта митохондрий — NADH-зависимой реакции МДГ (NADH-МДГ). Пониженная активность данной ферментативной реакции может определить низкий уровень водородного

градиента митохондрий и, соответственно, недостаточность аэробного дыхания клеток.

Общей особенностью метаболизма митохондриального компартмента нейтрофилов у женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза является повышение активности NAD-ГДГ и NADH-ГДГ. НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа принимает активное участие во внутриклеточном обмене азота и осуществляет субстратное взаимодействие цикла трикарбоновых кислот и реакций аминокислотного обмена [25, 26].

С помощью корреляционного анализа исследована зависимость интенсивности и кинетики респираторного взрыва нейтрофилов от активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Обнаружено, что у здоровых людей интенсивность синтеза первичных и вторичных АФК (максимум интенсивности и площадь под кривой хемилюминесценции) преимущественно зависит от активности NADP-зависимых ферментов (Г3ФДГ, NADP-МДГ, NADP-ИЦДГ и ГР). Причем, активность Г3ФДГ, NADP-МДГ и NADP-ИЦДГ положительно влияет на интенсивность дыхательного взрыва нейтрофилов, тогда как активность ГР — отрицательно на уровень синтеза супероксид-радикала. Данный механизм зависимости интенсивности респираторного взрыва нейтрофилов определяется значимостью NADPH в стимуляции активности NADPH-оксидазы, синтезе супероксид-радикала и стимуляции синтеза вторичных АФК. ГР, во-первых, является конкурентом NADPH-оксидазы за кофермент и, во-вторых, активация фермента связана с повышением интенсивности перекисных процессов и соответствующим снижением уровня дыхательного взрыва. Кроме того, у здоровых людей выявляется положительная зависимость времени выхода на максимум интенсивности по синтезу вторичных АФК от активности ферментов энергетического профиля (Г3ФДГ и МДГ). Данная зависимость характеризует замедление развития респираторного взрыва нейтрофилов при повышении интенсивности энергетических реакций.

У больных хроническим эндометритом значительно снижается количество взаимосвязей между уровнями активности ферментов и показателями респираторного взрыва нейтрофилов. Обнаружено, что время выхода на максимум интенсивности респираторного взрыва прямо пропорционально определяется активностью NADP-ГДГ и Г3ФДГ, тогда как индексы ак-

тивации зависят от ферментов энергетического профиля: выявляется обратная зависимость анаэробной реакции ЛДГ и индекса активации по синтезу первичных АФК и прямая зависимость между активностью NAD-ИЦДГ и индексом активации по синтезу вторичных АФК. Следовательно, у больных хроническим эндометритом нарушения метаболизма нейтрофильных гранулоцитов реализуются в изменении влияния активности исследуемых ферментов на синтез АФК. У больных хроническим эндометритом интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов стимулируется реакциями, определяющими аэробное дыхание, и ингибируется реакциями, характеризующими анаэробное дыхание.

У больных хроническим аднекситом значительно увеличивается количество корреляционных связей между показателями респираторного взрыва нейтрофилов и внутриклеточной активностью ферментов. У больных данной группы обнаружены корреляционные связи, которые также наблюдаются у лиц контрольной группы и больных хроническим эндометритом. Так, при хроническом аднексите, также как и у здоровых людей, установлена положительная зависимость времени выхода на максимум интенсивности по синтезу вторичных АФК от активности ферментов энергетического профиля (Г3ФДГ и МДГ), а также зависимость от активности NADP-ГДГ и NADP-МДГ. Однако синтез первичных АФК имеет выраженную особенность, которая определяется взаимосвязями показателей люцигенин-зависимой хемилюминесценции с активностью ГР. Если у здоровых людей активность ГР только отрицательно коррелирует с уровнем синтеза первичных АФК, то у больных хроническим аднекситом — только положительно. Такая зависимость характеризует сонправленность в активности NADPH-оксидазы и интенсивности глутатион-зависимых антиоксидантных реакций в нейтрофилах. В целом, у больных хроническим аднекситом интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов стимулируется активностью NADP-зависимых дегидрогеназ, интенсивностью антиоксидантных реакций и уровнем субстратного потока по циклу Кребса.

Таким образом, при хроническом эндометрите и аднексите установлены характерные для каждого заболевания изменения показателей респираторного взрыва и активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов. При хроническом эндометрите обнаружена высо-

кая интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов, которая определяется повышением уровня синтеза первичных и вторичных АФК. Однако длительный инфекционно-воспалительный процесс при хроническом эндометрите приводит к истощению метаболических резервов нейтрофильных гранулоцитов для синтеза первичных АФК. У больных хроническим аднекситом респираторный взрыв нейтрофилов реализуется при дисбалансе синтеза первичных и вторичных АФК: при сниженной активности NADPH-оксидазы наблюдается высокий уровень синтеза вторичных АФК. Метаболизм нейтрофилов у женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза характеризуется высоким уровнем липидного обмена и НАД-зависимого субстратного потока между реакциями цикла трикарбонных кислот и аминокислотного обмена. При этом особенностью метаболизма нейтрофилов при хроническом эндометрите является высокая активность МДГ. В то же время, характерными особенностями метаболизма нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим аднекситом являются снижение интенсивности анаэробного гликолиза и активности NADP-ИЦДГ, а также понижение NADP-зависимого субстратного обмена между реакциями цикла трикарбонных кислот и аминокислотного обмена. Недостаточность энергетических процессов в нейтрофилах крови у больных хроническим аднекситом также может определяться снижением ключевой реакции малат-аспартатного шунта митохондрий. С помощью корреляционного анализа установлено, что у здоровых людей интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов, прежде всего, зависит от активности NADP-зависимых дегидрогеназ внутриклеточной системы пластического обмена, при минимальном участии ферментов энергетического профиля и отрицательном влиянии ГР. При хроническом эндометрите количество взаимосвязей между показателями респираторного взрыва и метаболизма нейтрофилов снижено, характерной особенностью является ингибирующее влияние на индуцированный синтез первичных АФК анаэробной реакции лактатдегидрогеназы. У женщин с хроническим аднекситом респираторный взрыв нейтрофилов также зависит от активности NADP-зависимых дегидрогеназ, но при более выраженном влиянии ферментов энергетического профиля. Также характерной особенностью при хрониче-

ском аднексите является стимулирующее влияние на синтез первичных АФК активности ГР. Определение механизмов метаболической регуляции респираторного взрыва нейтрофилов позволяет охарактеризовать регуляторные аспекты иммунопатогенеза инфекционно-воспалительных заболеваний и может явиться основой для разработки новых методов иммунометаболической терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Борисов А. Г., Савченко А. А., Соколовская В. К. Заболеваемость, связанная с нарушениями функции иммунной системы (на примере Красноярского края). Здравоохранение Российской Федерации 2014, 58(6), 38–41. [Borisov A. G., Savchenko A. A., Sokolovskaya V. K. The morbidity related to disorders of immune system function as exemplified by the Krasnoyarsk region. Healthcare of the Russian Federation 2014, 58(6), 38–41. Russian].
2. Wadhwa N., Raoot A. An unusual case of adult filarial oophoritis. International Society of Gynecological Pathologists 2011, 30(6), 549–552.
3. Савченко А. А., Каспаров Э. В., Арутюнян С. С., Борисов А. Г., Кудрявцев И. В., Мошев А. В. Фенотипический состав В-лимфоцитов у женщин с хроническим эндометритом и аднекситом. Медицинская иммунология 2016, 18(4), 379–384. [Savchenko A. A., Kasparov E. V., Arutyunyan S. S., Borisov A. G., Kudryavtsev I. V., Moshev A. V. Phenotypic profile of B-lymphocytes in women with chronic endometritis and adnexitis. Medical Immunology (Russia) 2016, 18(4), 379–384. Russian].
4. Yasui T., McCann K., Gilbert R. O., Nydam D. V., Overton T. R. Associations of cytological endometritis with energy metabolism and inflammation during the periparturient period and early lactation in dairy cows. American Dairy Science Association 2014, 97(5), 2763–2770.
5. Савченко А. А., Здзитовецкий Д. Э., Борисов А. Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013, 142 с. [Savchenko A. A., Zdzitoveckij D. E., Borisov A. G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk: Nauka, 2013, 142 p. Russian].
6. Lavoie-Lamoureux A., Moran K., Beauchamp G., Mauel S., Steinbach F., Lefebvre-Lavoie J., Martin J. G., Lavoie J. P. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 2010, 299(4), L472–L482.
7. Pham Van L., Germaud N., Ramadan A., Thieblemont N. MyD88 modulates eosinophil and neutrophil recruitment as well as IL-17A production during allergic inflammation. Cellular immunology 2016, 310, 116–122.

8. *Tan S. Y., Weninger W.* Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Current opinion in immunology* 2016, 44, 34–42.
9. *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, 12(1–2), 115–119. [*Savchenko A. A., Zdzitoveckij D. E., Borisov A. G., Luzan N. A.* Chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and cytokine concentrations in patients with advanced purulent peritonitis. *Cytokines and inflammation* 2013, 12(1–2), 115–119. Russian].
10. *Шкапова Е. А., Куртасова Л. М., Савченко А. А.* Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2010, 149(2), 201–203. [*Shkapova E. A., Kurtasova L. M., Savchenko A. A.* The indicators of the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils by the patients with kidney cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2010, 149(2), 201–203. Russian].
11. *Li H., Zhao Y., Li W., Yang J., Wu H.* Critical role of neutrophil alkaline phosphatase in the antimicrobial function of neutrophils. *Life sciences* 2016, 157, 152–157.
12. *McGovern N. N., Cowburn A. S., Porter L., Walmsley S. R., Summers C., Thompson A. A., Anwar S., Willcocks L. C., Whyte M. K., Condliffe A. M., Chilvers E. R.* Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *The Journal of immunology* 2011, 186(1): 453–463.
13. *Sun D., Crowell S. A., Harding C. M., De Silva P. M., Harrison A., Fernando D. M., Mason K. M., Santana E., Loewen P. C., Kumar A., Liu Y.* KatG and KatE confer *Acinetobacter* resistance to hydrogen peroxide but sensitize bacteria to killing by phagocytic respiratory burst. *Life sciences* 2016, 148, 31–40.
14. *Савченко А. А.* Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015, 159(5), 656–660. [*Savchenko A. A.* Evaluation of NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Activities in Neutrophilic Granulocytes by the Bioluminescent Method. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015, 159(5), 692–695. Russian].
15. *Azevedo E. P., Rochaël N. C., Guimarães-Costa A. B., de Souza-Vieira T. S., Ganilho J., Saraiva E. M., Palhano F. L., Foguel D.* A Metabolic Shift toward Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for Amyloid Fibril- and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *The Journal of biological chemistry* 2015, 290(36), 22174–22183.
16. *Kazumura K., Sato Y., Satozono H., Koike T., Tsuchiya H., Hiramatsu M., Katsumata M., Okazaki S.* Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2013, 84, 90–96.
17. *Rezende F., Prior K. K., Löwe O., Wittig I., Strecker V., Moll F., Helfinger V., Schnütgen F., Kurrle N., Wempe F., Walter M., Zukunft S., Luck B., Fleming I., Weissmann N., Brandes R. P., Schröder K.* Cytochrome P450 enzymes but not NADPH oxidases are the source of the NADPH-dependent lucigenin chemiluminescence in membrane assays. *Free radical biology and medicine* 2017, 102, 57–66.
18. *Douillard S., Rozec B., Bigot E., Aillet L., Patrice T.* Secondary reactive oxygen species production after PDT during pulmonary tumor growth in sera of nude mice. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2013, 10(1), 62–71.
19. *Trujillo M.* Analysis of the Immunity-Related Oxidative Bursts by a Luminol-Based Assay. *Methods in molecular biology* 2016, 1398, 323–329.
20. *Balteau M., Tajeddine N., de Meester C., Ginion A., Des Rosiers C., Brady N. R., Sommereyns C., Horman S., Vanoverschelde J. L., Gailly P., Hue L., Bertrand L., Beauloye C.* NADPH oxidase activation by hyperglycaemia in cardiomyocytes is independent of glucose metabolism but requires SGLT1. *Cardiovascular research* 2011, 92(2), 237–246.
21. *Cai T., Kuang Y., Zhang C., Zhang Z., Chen L., Li B., Li Y., Wang Y., Yang H., Han Q., Zhu Y.* 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. *American journal of cancer research* 2015, 5(5), 1610–1620.
22. *Sato T., Morita A., Mori N., Miura S.* The role of glyceral-3-phosphate dehydrogenase 1 in the progression of fatty liver after acute ethanol administration in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 2014, 444(4), 525–530.
23. *Liu L., Shah S., Fan J., Park J. O., Wellen K. E., Rabinowitz J. D.* Malic enzyme tracers reveal hypoxia-induced switch in adipocyte NADPH pathway usage. *Nature chemical biology* 2016, 12(5), 345–352.
24. *Bao Y., Ledderose C., Seier T., Graf A. F., Brix B., Chong E., Junger W. G.* Mitochondria regulate neutrophil activation by generating ATP for autocrine purinergic signaling. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289(39), 26794–26803.
25. *Plaitakis A., Kalef-Ezra E., Kotzamani D., Zaganas I., Spanaki C.* The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology (Basel)* 2017, 6(1), E11.
26. *Zhu M., Fang J., Zhang J., Zhang Z., Xie J., Yu Y., Ruan J. J., Chen Z., Hou W., Yang G., Su W., Ruan B. H.* Biomolecular Interaction Assays Identified Dual Inhibitors of Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase That Disrupt Mitochondrial Function and Prevent Growth of Cancer Cells. *Analytical chemistry* 2017, 89(3), 1689–1696.

**DEPENDENCE OF NEUTROPHILES RESPIRATORY BURST FROM
THE STATE OF THEIR METABOLIC PROCESSES IN PATIENTS
WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND ADNEXITIS**

© 2018 A. A. Savchenko, E. V. Kasparov, S. S. Arutjunjan,
A. G. Borisov, I. I. Gvozdev

*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, Russia*

Received: 08.05.2018. **Accepted:** 20.06.2018

The purpose of this work was to study the dependence of neutrophils respiratory burst from the activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases in patients with chronic endometritis and adnexitis. The study involved 89 women of reproductive age with chronic endometritis and adnexitis. As a control were examined 98 healthy women of a similar age range. The respiratory burst condition of blood neutrophils was examined using a chemiluminescent assay. Investigation of the NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in neutrophils was carried out using the bioluminescent method. A high intensity of the respiratory explosion of neutrophils was detected in chronic endometritis that was determined by an increase in the synthesis of primary and secondary reactive oxygen species (ROS). In patients with chronic adnexitis a respiratory burst of neutrophils occurs in the imbalance of synthesis of primary and secondary ROS: with a reduced activity of NADPH-oxidase there was a high level of secondary ROS synthesis. Metabolism of neutrophils in women with infectious and inflammatory diseases of the pelvic organs is characterized by a high level of lipid metabolism and NAD-dependent substrate flow between the reactions of the tricarboxylic acid cycle and the amino acid exchange. A feature of neutrophil metabolism in chronic endometritis is the high activity of malate dehydrogenase. Characteristic features of neutrophil granulocyte metabolism in patients with chronic adnexitis are a decrease in the intensity of anaerobic glycolysis and NADP-dependent substrate flow between the reactions of the tricarboxylic acid cycle and the amino acid exchange. The relationship between respiratory explosion rates and neutrophil metabolism in chronic endometritis reflects the inhibitory effect of the anaerobic reaction of lactate dehydrogenase on the induced synthesis of primary ROS. The respiratory explosion of neutrophils in women with chronic adnexitis depends on the activity of NADP-dependent dehydrogenases, but with the pronounced effect of enzymes in the energy profile. A characteristic feature of chronic adnexitis also is a stimulating effect on the synthesis of primary ROS activity of glutathione reductase. Determination of the metabolic regulation mechanisms of respiratory burst in neutrophils allows us to characterize the regulatory aspects of immunopathogenesis of infectious and inflammatory diseases and can be the basis for the development of new methods of immunometabolic therapy.

Key words: chronic endometritis, chronic adnexitis, neutrophils, respiratory burst, metabolism, dehydrogenase activity

Authors:

Savchenko A. A., ✉ MD, professor, head of the laboratory of molecular-cellular physiology and pathology in the Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;
660022 Krasnoyarsk, Scientific Research Institute of medical problems of the North.
Phone: +79059713715, **E-mail:** aasavchenko@yandex.ru;

Kasparov E. V., doctor of medicine, professor, director of the Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

Arutjunjan S. S., doctor of gynecological department of the Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

Borisov A. G., PhD, leading researcher in the laboratory of Molecular-cellular physiology and pathology of the Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

Gvozdev I. I., junior researcher in the laboratory of Molecular-cellular physiology and pathology of the Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia.