

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В МОДУЛЯЦИИ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА¹, Татьяна Васильевна ЖАВОРОНОК¹,
Елена Алексеевна СТЕПОВАЯ¹, Юрий Витальевич СТАРИКОВ¹, Татьяна Сергеевна АГЕЕВА²,
Виктор Яковлевич МИТАСОВ³, Евгений Георгиевич СОКОЛОВИЧ¹

¹ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

²ФГОУ ВПО Томский военно-медицинский институт МО РФ
634041, г. Томск, пр. Кирова, 49

³ММЛПУ Городская больница № 1
634029, г. Томск, ул. Красноармейская, 14

Проведено исследование апоптоза нейтрофилов крови, полученных у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (внебольничная пневмония, острый аппендицит). Установлено повышение количества аннексин-положительных клеток, содержания белка Вах и продукции активных форм кислорода в нейтрофилах при остром воспалении разного генеза, сопоставимое с увеличением этих показателей при окислительном стрессе *in vitro* (в условиях инкубации нейтрофилов здоровых доноров с 5 мМ H₂O₂). Приводятся данные об участии ключевых белков-регуляторов семейства Bcl-2 и основных элементов системы сигнальной трансдукции в опосредованной прооксидантами модуляции апоптоза эффекторных клеток острого воспаления. Показано, что в регуляцию апоптоза нейтрофилов при остром воспалении существенный вклад вносят цГМФ-зависимые механизмы, сопряженные с повышением синтеза оксида азота (NO), а в условиях окислительного стресса *in vitro* — Ca²⁺- и цАМФ-зависимые процессы регуляции танатогенной программы.

Ключевые слова: нейтрофилы, апоптоз, острое воспаление, окислительный стресс.

Основное внимание при изучении патогенеза острых воспалительных заболеваний уделяется реакциям сосудистой системы и состоянию нейтрофильных лейкоцитов, которые активно эмигрируют из крови в область повреждения, являясь эффекторами и модуляторами острой фазы воспаления. Патогенез острого воспаления во многом зависит от функциональной активности нейтрофилов, выполняющих микробицидные функции посредством фагоцитоза и продукции активных форм кислорода (АФК). Нейтрофилы становятся главным источником избытка АФК не только в клетках окружающих тканей. Гиперпродукция АФК в самих нейтрофильных гранулоцитах [1] может приводить к нарушению функций, повреждению и гибели клеток вследствие развития окислительного стресса (ОС) [2, 3]. Апоптоз нейтрофилов выступает доминирующим звеном патогенеза острых воспалительных заболеваний, поскольку быстро развивающаяся спонтанная и активированная элиминация

эффекторных клеток обеспечивает сдерживающий механизм поражения тканей и разрешение процесса воспаления [1, 4]. Регуляция апоптоза нейтрофилов опосредована внутриклеточными сигнальными системами (Ca²⁺, цАМФ, цГМФ) и балансом ключевых про- и антиапоптотических белков [1, 5], особенно в ситуациях, связанных с нарушением редокс-метаболизма клетки [6]. Одним из ведущих факторов, участвующих как в формировании ОС, так и в развитии апоптоза, выступает оксид азота (NO). При этом описаны диаметрально противоположные эффекты NO на развитие программы клеточной гибели [7–10]. Установление молекулярных механизмов регуляции продолжительности жизни нейтрофильных лейкоцитов необходимо для создания селективных технологий управления воспалительным процессом.

Целью настоящей работы была идентификация редокс-опосредованных молекулярных мишеней, участвующих в механизмах регуляции программы

Рязанцева Н.В. — д.м.н., проф., зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины, e-mail: ryazan@mail.tomsknet.ru

Жаворонок Т.В. — к.м.н., доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: tavaza@ngs.ru

Степова Е.А. — д.м.н., проф. кафедры биохимии и молекулярной биологии, e-mail: tuir@mail.ru

Стариков Ю.В. — к.м.н., ст. лаборант кафедры фундаментальных основ клинической медицины, e-mail: snil@mail.ru

Агеева Т.С. — к.м.н., доцент, зав. кафедрой терапии и усовершенствования врачей, e-mail: ts.ageeva@mail.ru

Митасов В.Я. — к.м.н., зав. хирургическим отделением, e-mail: mitasov1960@mail.ru

Соколович Е.Г. — д.м.н., проф. кафедры госпитальной хирургии, e-mail: sokole@vtomske.ru

рованной гибели нейтрофилов при остром воспалительном процессе.

Материал и методы

Материалом для исследования служили нейтрофилы венозной крови, полученной у 54 пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (30 мужчин и 24 женщины) в возрасте от 18 до 50 лет ($32,0 \pm 3,0$ лет), в том числе 29 больных внебольничной пневмонией средней степени тяжести (13 мужчин и 16 женщин) и 25 лиц с острым катаральным или флегмонозным аппендицитом (17 мужчин и 8 женщин). Все пациенты поступали в стационар в порядке скорой медицинской помощи, после получения информированного согласия до проведения терапии у них забирали кровь с использованием стандартных вакуумных систем BD VACUTAINER™ с гепарином лития. Контролем служили интактные нейтрофилы, полученные у 32 здоровых доноров (18 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 18 до 45 лет ($25,0 \pm 5,4$ лет). Исследования одобрены этическим комитетом ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, протокол № 23 от 15.11.2004.

Нейтрофильные лейкоциты выделяли на двойном градиенте плотности Ficoll-Paque ($1,077 \text{ г/см}^3$) (GE Healthcare, Швеция) и фиколл-урографин ($1,095 \text{ г/см}^3$) (фиколл — GE Healthcare, Швеция; урографин — Шеринг, Россия). Суспензию нейтрофилов трижды отмывали в среде RPMI-1640 (Вектор-Бест, Россия), количество клеток стандартизовали до 2×10^6 в 1 мл среды. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5% трипановым синим (Serva, США) составляла 95 %. Выделенные клетки культивировали в течение 18 ч в присутствии 5 % CO_2 при 37 °C в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, 2 мМ NEPES (Flow, Великобритания), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия), инактивированной при 56 °C в течение 30 мин. Праймированные нейтрофилы при остром воспалении по многим характеристикам отличны от нестимулированных клеток в здоровом организме. С целью стандартизации исследований проводили контрольный эксперимент *in vitro* по моделированию ОС в нейтрофилах, полученных у здоровых доноров, для чего в клеточные культуры добавляли H_2O_2 в конечной концентрации 5 мМ, способной вызывать апоптоз максимального возможного числа клеток без активации процессов некроза [7].

В культурах нейтрофилов оценивали число клеток, вступивших в апоптоз, внутриклеточное содержание АФК и Ca^{2+} методом лазерной проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter, Франция). Для оценки раннего апоптоза нейтрофилы инкубировали 10 мин с FITC-меченным аннексином V (Beckman Coulter, Франция), связывающимся с фосфатидилсерином на внешней поверхности плазмалеммы [11]. Результат выражали в числе (%) клеток, вступивших в апоптоз. Продукцию АФК в нейтрофилах определяли, инкубируя клетки в течение 20 мин в присутствии дихлорфлуоресцеина диацетата (Sigma

Aldrich, США) [12] — красителя, который начинает флуоресцировать после реакции с H_2O_2 . Содержание кальция в нейтрофилах определяли методом [13], инкубируя клетки 10 мин с липофильным зондом Fluo 3 AM (MP Biomedicals, США), способным флуоресцировать после связывания с ионами Ca^{2+} . В обоих случаях результат представляли в условных единицах (у.е.), что было равно отношению интенсивности флуоресценции дихлорфлуоресцеина диацетата или, соответственно, Fluo 3 AM к общему числу клеток (интенсивность свечения на клетку).

Наличие ключевых белков-регуляторов апоптоза Bax и Bcl-2 в нейтрофилах определяли методом вестерн-блоттинга. Клеточные экстракты получали путем лизиса нейтрофилов в фосфатно-солевом буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl буфера (pH 6,5), 100 мМ дитиотреитола (Helikon, США), 2 % додецилсульфата натрия (Helikon, США), 0,1 % бромфенолового синего, 15 % глицерола (Helikon, США), смесь протеазных ингибиторов (Sigma Aldrich, США). Белки разделяли по молекулярной массе под действием электрического поля в течение 60 мин при напряжении 120 В, затем электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 90 мин при силе тока 60 мА. Нитроцеллюлозные блоты блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в фосфатно-солевом буфере, инкубировали с первичными антителами к белкам Bax или Bcl-2 (Biosource, США) (разведение 1:200 — 1:400), добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой (Biosource, США), визуализировали результаты с помощью преципитирующего субстрата пероксидазы. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу (антитела фирмы Chemicon, США), выражая результат как соотношение сигнала определяемого белка и сигнала глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы.

Содержание циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в нейтрофилах оценивали методом конкурентного твердофазного радиоиммунного анализа с использованием наборов «RIA AMPc/cAMP» и «RIA cGMP» (Immunotech, Франция). В среде инкубации нейтрофилов определяли количество метаболитов NO методом, основанным на цветной реакции с реактивом Грисса, содержащим 1 % сульфаниламида (MP Biomedicals, США) и 0,1 % нафтилендиамина (MP Biomedicals, США), разведенных в 12% уксусной кислоте [14]; перед определением восстанавливали имеющиеся в среде нитраты до нитритов, используя омедненный кадмиевый редуктор. Калибровочную кривую строили по нитриту натрия в диапазоне концентраций от 0 до 150 мкМ.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики и представляли в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 – Q_3). Нормальность распределения полученных результатов оценивали с помощью критерия Колмогорова — Смирнова, достоверность различий средних величин — с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы определяли признаки формирования ОС и активации программы гибели нейтрофилов при острых воспалительных заболеваниях разного генеза — внебольничной пневмонии и остром аппендиците. Было обнаружено, что внутриклеточная продукция АФК, проапоптотического белка Вах в нейтрофильных лейкоцитах и число аннексин-положительных клеток значимо превышали контрольные величины ($p < 0,05$) и статистически не отличались в обеих подгруппах ($p > 0,05$) (табл. 1, рис.). В нейтрофилах не был обнаружен антиапоптотический протеин Bcl-2, что согласуется с данными литературы [4].

Обращало на себя внимание отсутствие значимых различий в значениях показателей у больных острым аппендицитом и у пациентов с внебольничной пневмонией. Данный фактический материал может быть свидетельством формирования при острых воспалительных заболеваниях разной локализации типовых реакций клеток на ОС, обеспечивающих, в частности, элиминацию нейтрофилов, в том числе путем апоптоза. Это позволило объединить обе обследован-

ные категории больных в одну клиническую группу (табл. 1), далее в работе для сравнительного анализа использовали данные объединенной группы.

Одной из основных мишеней АФК являются митохондрии, которым принадлежит ключевая роль в реализации внутреннего пути клеточной гибели. АФК вызывают открытие пор в митохондриальной мембране с последующим выходом в цитозоль проапоптотических белков (цитохром *c*, AIF, Smac, прокаспазы 9, эндонуклеаза G и др.) и ионов кальция [1, 3]. В свою очередь, высвобождение цитохрома *c* приводит к резкому повышению продукции АФК в клетках и активации каспазного каскада. АФК также могут влиять на жизнеспособность клетки, меняя экспрессию ряда генов за счет активации факторов транскрипции — p53, NF-κB, AP-1 [2]. Вероятно, формирование ОС в эффекторных клетках острого воспаления изменяет функционирование редокс-чувствительных сигнальных систем, внося существенный вклад в индукцию танатогенной программы нейтрофилов и определяя активацию синтеза проапоптотических белков семейства Bcl-2, в том числе белка Вах.

Таблица 1

Количество аннексин-положительных и некротических клеток, содержание метаболитов NO в среде инкубации и внутриклеточная продукция активных форм кислорода в культурах нейтрофилов крови при остром воспалительном процессе и экспериментальном окислительном стрессе (Me(Q1–Q3))

Группы обследованных		Количество аннексин-положительных клеток, %	Количество нейтрофилов, окрашенных трипановым синим, %	Содержание метаболитов NO в среде инкубации, мкМ	Продукция АФК, у.е. (интенсивность свечения на клетку)
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль), n = 32	49,25 (45,03–58,13)	3,20 (2,70–3,90)	0,108 (0,106–0,110)	0,240 (0,214 – 0,259)
	Нейтрофилы, инкубированные с 5 мМ H ₂ O ₂ , n = 32	61,10 (57,80–67,50) p ₁ < 0,05	4,30 (3,50–5,60) p ₁ > 0,05	0,121 (0,120–0,132) p ₁ < 0,05	0,678 (0,596–0,705) p ₁ < 0,05
Пациенты с острыми воспалительными заболеваниями	Нейтрофилы пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, n = 54	61,75 (56,93–65,80) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	4,70 (4,20–6,00) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	0,157 (0,153–0,161) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05	0,659 (0,568–0,698) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05
	Нейтрофилы пациентов с внебольничной пневмонией, n = 29	62,37 (54,25–69,20) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	5,50 (4,30–6,50) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	0,141 (0,136–0,150) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05	0,653 (0,574–0,728) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05
	Нейтрофилы пациентов с острым аппендицитом, n = 25	57,40 (51,37–62,37) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	4,20 (3,80–5,70) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,158 (0,149–0,163) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ > 0,05	0,673 (0,561–0,690) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05

Примечание: здесь и в табл. 2: p₁ — достоверность отличия показателя от значения, полученного у здоровых доноров (контроль); p₂ — достоверность отличия показателя от значения в условиях экспериментального окислительного стресса (культивирование нейтрофилов с 5 мМ H₂O₂); p₃ — достоверность отличия показателя от значения, полученного у пациентов с внебольничной пневмонией; n — количество обследованных в группе.

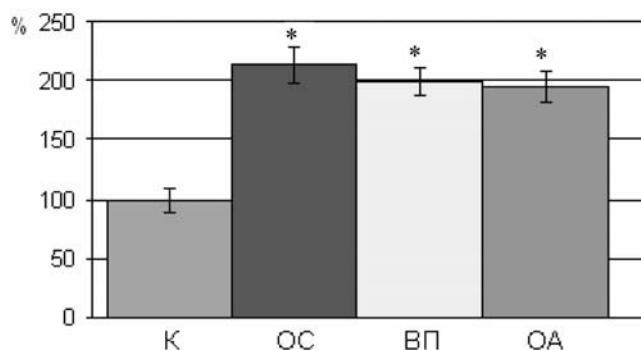


Рис. Содержание белка Вах в культурах нейтрофилов при острых воспалительных заболеваниях и окислительном стрессе *in vitro* (по отношению к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы, используемого при вестерн-блот анализе в качестве стандарта и внутреннего контроля). К — интактная культура клеток здоровых доноров (показатель принят за 100 %); ОС — клетки здоровых доноров, культивированные с 5 мМ H_2O_2 ; ВП — культуры клеток, полученных у больных внебольничной пневмонией; ОА — культуры клеток, полученных у больных острым аппендицитом; * — отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

При инкубации клеток, полученных у здоровых доноров, с 5 мМ H_2O_2 в нейтрофилах оценивали те же параметры, что и при острых воспалительных заболеваниях (табл. 1, рис.). Пероксид водорода индуцировал в нейтрофилах экспериментальный ОС, сопровождающийся выраженной активацией апоптоза, и способствовал достижению показателей, сравнимых с выявленными при остром воспалении. Эти факты свидетельствуют о соответствии используемой нами модели ОС и выбранной концентрации H_2O_2 задаче имитации поведения нейтрофилов при вхождении в апоптоз в ходе острых воспалительных заболеваний.

В условиях ОС *in vitro* усиление генерации АФК в нейтрофилах приводило к росту проницаемости мембран митохондрий, на что указывало увеличение

концентрации Ca^{2+} в цитозоле клеток по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл. 2). Принимая во внимание, что митохондрии являются резервуаром ионов кальция и проапоптотических факторов, изменение проницаемости мембран этих органелл критично для адекватной регуляции гомеостаза клетки. В низких концентрациях ионы кальция в качестве внутриклеточных мессенджеров опосредуют регуляцию метаболизма клетки. Поступление в цитоплазму высоких концентраций Ca^{2+} , равно как и цитохрома с, приводит к запуску запрограммированной клеточной гибели [3]. Проницаемость мембран митохондрий во многом определяется экспрессией белков семейства Bcl-2. Зарегистрированные нами активация апоптоза нейтрофилов с увеличением уровня белка Вах и рост концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток указывают на участие данного белка в образовании пор, обеспечивающих выход Ca^{2+} из матрикса и апоптоз-индуцирующих протеинов из межмембранного пространства митохондрий. Под действием стрессовых стимулов Вах может олигомеризоваться и за счет изменений конформации образовывать поры в мембранах [15]. Олигомерные комплексы белка Вах также способны участвовать в активации митохондриального пути регуляции апоптоза и активировать поры пермеабилizационного перехода, образованные VDAC (потенциал-зависимый анионный канал), ANT (транслоказа адениловых нуклеотидов) и циклофилином D, тем самым дополнительно содействуя выходу из митохондрий Ca^{2+} и апоптоз-индуцирующих протеинов.

Однако на фоне острого воспаления количество ионов Ca^{2+} в цитоплазме нейтрофильных гранулоцитов было достоверно ниже аналогичного показателя при индукции ОС *in vitro* ($p < 0,05$) и регистрировалось на уровне значений контроля ($p > 0,05$). Ограничение выхода Ca^{2+} в цитозоль нейтрофилов может быть обусловлено действием цитокинов и редокс-регуляцией компонентов кальциевого гомеостаза. Это необходимо для оптимизации передачи сигналов в клетке посредством Ca^{2+} , их направлен-

Таблица 2

Внутриклеточная концентрация ионов кальция и циклических нуклеотидов в культурах нейтрофилов, полученных у больных острыми воспалительными заболеваниями и в условиях окислительного стресса *in vitro* ($Me(Q_1-Q_3)$)

Группы обследованных	Содержание цАМФ, нМ/10 ⁶ клеток	Содержание цГМФ, нМ/10 ⁶ кл	цАМФ/цГМФ	Содержание Ca^{2+} , у.е.
Нейтрофилы здоровых доноров (контроль), n = 32	114,13 (101,96–120,55)	12,25 (10,48–17,04)	9,32	0,220 (0,114–0,234)
Нейтрофилы здоровых доноров, инкубированные с 5 мМ H_2O_2 , n = 32	134,97 (117,36–139,39) $p_1 < 0,05$	4,16 (3,91–7,88) $p_1 < 0,05$	32,44	0,444 (0,403–0,489) $p_1 < 0,05$
Нейтрофилы пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, n = 54	88,58 (67,42–121,71) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	4,06 (3,48–5,79) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	21,82	0,231 (0,211–0,263) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

ности и эффективности с целью поддержания адекватности функционирования и длительности жизни эффекторных клеток в условиях острого воспаления. В частности, нейтрофилам для выброса бактерицидного содержимого из вторичных или азурофильных гранул требуется рост концентрации внутриклеточного Ca^{2+} лишь в небольших пределах.

Важнейший вклад в развитие ОС вносит оксид азота, который одновременно является медиатором клеточного метаболизма. Нами отмечен значимый рост содержания метаболитов NO в среде инкубации нейтрофилов относительно контрольных величин как в случае острого воспаления ($p < 0,05$), так и при ОС *in vitro* ($p < 0,05$) (табл. 1). Однако значения данного показателя у пациентов с воспалительными заболеваниями были выше таковых при моделировании ОС ($p < 0,05$). Это может быть обусловлено необходимостью дополнительного образования NO с целью дилатации стенок сосудов в условиях гипоксии, сопутствующей острому воспалению. В нейтрофилах, стимулированных при остром воспалении флогеном и цитокинами ($\text{TNF}\alpha$, IL-8 и др.), активируется индуцибельная NO-синтаза, которая не нуждается в Ca^{2+} и может поддерживать высокую активность несколько дней [1, 2]. При развитии ишемии в ходе воспаления стационарные концентрации NO достигают микромолярных значений, что резко увеличивает вероятность взаимодействия молекул NO с образующим NO_2^+ , который является более сильным прооксидантом и нитрозилирующим агентом [10], а также появления других активных метаболитов — пероксинитрита ONOO^- , ионов нитрозония NO^+ , нитроксила NO^- и др. Такое разнообразие метаболитов повышает возможность участия в регуляции апоптоза молекул NO, которые способны проявлять как антиапоптотические [2, 8, 9], так и проапоптотические эффекты [4, 8].

Основной мишенью NO в клетке является растворимая гуанилатциклаза, которая в ответ на стимул продуцирует внутриклеточный мессенджер цГМФ, активирующий систему G-киназ Ca^{2+} -каналов эндоплазматического ретикулума и снижение концентрации внутриклеточного кальция [10]. В связи с этим одним из механизмов ограничения фатального выхода Ca^{2+} в цитозоль нейтрофилов при остром воспалении могло стать поддержание на более низком уровне индекса цАМФ/цГМФ — 21,82, который в условиях ОС *in vitro* составил 32,44 (табл. 2). Известно, что в регуляцию апоптоза нейтрофилов весомый вклад вносит сеть цАМФ-опосредованных сигналов [5]. В нашем исследовании цАМФ-зависимые механизмы были более актуальны при развитии апоптоза нейтрофилов в условиях ОС *in vitro*, чем в случае программированной гибели праймированных нейтрофилов, испытывающих редокс-дисбаланс при остром воспалении.

Заключение

Культивирование нейтрофилов, полученных у здоровых лиц, с 5 мМ H_2O_2 приводит к повышению внутриклеточного уровня АФК и развитию ОС, сопряженного с активацией апоптотической программы, что

сопоставимо с ситуацией при остром воспалительном процессе. Развитие апоптоза нейтрофилов при остром воспалении в клинике внутренних болезней и при экспериментальном ОС сопровождается ростом содержания в клетках проапоптотического протеина Вах и отсутствием экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2. Реализация летальной программы нейтрофилов при ОС *in vitro* в большей мере связана с выходом в цитозоль Ca^{2+} и ростом уровня цАМФ, чем в случае нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза этих клеток при остром воспалении, когда более существенным становится вклад NO/цГМФ-опосредованных механизмов. Следовательно, для эффективного функционирования и оптимизации срока жизни в условиях острого воспаления нейтрофилы нуждаются в поддержании редокс-статуса, зависящего от соотношения и выраженности продукции активных форм кислорода и азота, индуцирующих разнонаправленные каскады регуляторных сигналов в отношении клеточных мишеней, опосредующих развитие/блокирование апоптоза. Дисрегуляция апоптоза нейтрофилов, вовлеченных в процесс острого воспаления в различных тканях, может приводить к пролонгации и хронизации воспалительного процесса.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 02.740.11.0311, ГК № 02.740.11.5031) и при финансовой поддержке РФФИ 2009–2010 гг. (гранты 09-04-99026-р_офи, 09-04-99025-р_офи).

Список литературы

1. Maiani N.A., Maiani A.N., Kuipers T.W., Roos D. Apoptosis of neutrophils // Acta Haematol. 2004. 111. 56–66.
2. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
3. Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. Oxidative stress. Pro-oxidants and anti-oxidants. M.: Slovo, 2006. 556p.
4. Tiwari B.S., Belenghi B., Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death // Plant Physiol. 2002. 128. 1271–1281.
5. Regulation of neutrophil apoptosis / S.W. Edwards, D.A. Moulding, M. Derouet, R. Moots // J. Chem Immunol Allergy. 2003. Vol. 83. P. 204–224.
6. Krakstad C. cAMP protects neutrophils against TNF-alpha-induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac) // C. Krakstad, A.E. Christensen, S.O. Doskeland // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 76. P. 641–647.
7. Melley D.D., Evans T.W., Quinlan G.J. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome // Clin. Sci. 2005. 108. 413–424.

7. Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Стариков Ю.В. и др. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2008. 146. (12). 646–650.
- Stepovaya E.A., Zhavoronok T.V., Starikov Yu.V. et al. Regulatory role of nitric oxide in neutrophil apoptosis // Bul. eksperim. biologii i mediciny. 2008. 146. (12). 646–650.
8. Bruene B., Knethen V.A., Sandau K. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis // Cell Death Differ. 1999. 6. 969–975.
9. Choi B.M., Pae H.O., Jang S.I., Chung H.T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator // J. Biochem. Mol. Biol. 2002. 35. 116–126.
10. Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology // J. Biomed. Biotech. 2004. 24. 227–237.
11. Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // Cytometry. 1998. 31. 1–9.
12. Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation // Immunol. 1983. 130. 1910–1917.
13. Merritt J.E., Mc Carthy S.A., Davies M.P., Moores K.E. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca^{2+} // J. Biochem. 1990. 269. 513–519.
14. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М., 2004. 180 с.
- Golikov P.P. Nitric oxide in clinical picture of emergency diseases. М., 2004. 180 p.
15. Mikhailov V., Mikhailova M., Degenhardt K. et al. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release // J. Biol. Chem. 2003. 278. 5367–5376.

OXIDATIVE STRESS IN NEUTROPHIL CELL DEATH MODULATION DURING PATHOGENESIS OF ACUTE INFLAMMATORY DISEASES

Natal'ya Vladimirovna RYAZANTSEVA¹, Tat'yana Vasil'evna ZHAVORONOK¹,
Elena Alekseevna STEPOVAYA¹, Yurii Vital'evich STARIKOV¹, Tat'yana Sergeevna AGEEVA²,
Viktor Yakovlevich MITASOV³, Evgenii Georgievich SOKOLOVICH¹

¹Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moskovskii tract, 2

²Tomsk Military Medical Institute
634041, Tomsk, Kirov av., 49

³City Hospital № 1
634029, Tomsk, Krasnoarmeiskaya st., 14

The research of blood neutrophils taken from patients with acute inflammatory diseases (community-acquired pneumonia and acute appendicitis) has been conducted. The increase in annexin-positive cells amount, protein Bax content and oxygen active forms production in neutrophils at acute inflammation of various genesis comparable to the increase of these indices at oxidative stress *in vitro* (in conditions of neutrophils of healthy donors incubating with 5 mM H_2O_2) has been determined. The data on participation of key protein-regulators of family Bcl-2 and signal transduction system basic elements in oxidant-mediated modulation of acute inflammation effector cells apoptosis are given. It has been revealed that cGMP-dependent mechanisms (connected with the increased NO content) contribute greatly to neutrophil cell death regulation during acute inflammation, and during oxidative stress *in vitro* Ca^{2+} - and cAMP-dependent processes of thanatogenic program regulation.

Key words: neutrophils, apoptosis, oxidative stress, acute inflammation.

Ryazantseva N.V. — doctor of medical sciences, head of the chair for fundamental and clinical medicine,
e-mail: ryazan@mail.tomsknet.ru

Zhavoronok T.V. — candidate of medical sciences, assistant professor of the chair
for biochemistry and molecular biology, e-mail: tavaza@ngs.ru

Stepovaya E.A. — doctor of medical sciences, professor of the chair for biochemistry and molecular biology,
e-mail: muir@mail.ru

Starikov Yu.V. — candidate of medical sciences, senior laboratory assistant of the chair for fundamental
basis of clinical medicine, cnil@mail.ru

Ageeva T.S. — candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for therapy
and physician advanced training, e-mail: ts.ageeva@mail.ru

Mitasov V.Ya. — candidate of medical sciences, head of the surgical department, e-mail: mitasov1960@mail.ru

Sokolovich E.G. — doctor of medical sciences, professor of the chair for hospital surgery, e-mail: sokole@vtomske.ru