

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI685109>

EDN: MBGOJG

Исследование механизма воздействия аминоксигидрофталазиндиона натрия на метаболизм нейтрофильных гранулоцитов *in vitro*

А.А. Савченко¹, Е.Н. Анисимова¹, Е.А. Царькова², А.Г. Борисов¹¹ Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия;² Медицинская клиника «АксиоМед», Серпухов, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. В современном мире всё больше людей страдает от заболеваний, связанных с нарушениями в работе иммунной системы, что обуславливает необходимость разработки новых методов иммунотерапии. Перспективным направлением является определение механизма действия аминоксигидрофталазиндиона натрия (АДФН) на фагоцитирующие клетки иммунной системы — основной мишени терапевтического действия препарата. Механизм предполагается изучать на клеточном и субклеточном уровнях с помощью методов биолуминесцентного анализа.

Цель исследования. Изучить механизмы влияния АДФН (Тамерон®) на метаболизм нейтрофильных гранулоцитов *in vitro* у здоровых людей.

Методы. Обследовано 34 здоровые женщины в возрасте 23–33 лет. Биолуминесцентное определение активности прямых (НАД- и НАДФ-зависимых) реакций дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах проводили по разработанной нами методике с помощью биохилюминесцентного анализатора БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», г. Красноярск). Исследование метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов выполняли в двух постановках: опытной (с АДФН) и контрольной (без препарата).

Результаты. Биолуминесцентный анализ показал снижение активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ у здоровых женщин после 3-часовой инкубации в отсутствие АДФН. Это свидетельствует о замедлении субстратного потока по ключевым метаболическим путям, регулирующим анаэробный и аэробный энергетический обмен, а также пластические процессы в клетках, что приводит к снижению функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. В цитоплазматическом компартменте нейтрофильных гранулоцитов выявлено снижение активности ключевых реакций липидного анаболизма, реактивности глутатион-зависимой антиоксидантной системы, анаэробных и аэробных реакций лактатдегидрогеназы, а также снижение уровня субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот и ингибирование ключевой реакции малат-аспартатного шунта. При инкубации с АДФН подобные значимые изменения активности НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов выявляются только через 24 ч инкубации.

Заключение. АДФН *in vitro* в нейтрофильных гранулоцитах замедляет истощение клеточных ресурсов, задерживает снижение метаболической активности и биоцидной реактивности.

Ключевые слова: иммунотерапия; функциональная активность нейтрофилов; НАД-зависимые дегидрогеназы; НАДФ-зависимые дегидрогеназы; биолуминесцентный анализ.

Как цитировать:

Савченко А.А., Анисимова Е.Н., Царькова Е.А., Борисов А.Г. Исследование механизма воздействия аминоксигидрофталазиндиона натрия на метаболизм нейтрофильных гранулоцитов *in vitro* // Цитокины и воспаление. 2024. Т. 21, № 4. С. 213–220. DOI: 10.17816/CI685109 EDN: MBGOJG

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI685109>

EDN: MBGOJG

Study of Aminodihydrophthalazinedione Sodium Mechanism of Action on the Metabolism of Neutrophilic Granulocytes *In Vitro*

Andrei A. Savchenko¹, Elena N. Anisimova¹, Elena A. Tsarkova², Alexandr G. Borisov¹¹ Krasnoyarsk Science Centre of the Siberian Branch of Russian Academy of Science, Krasnoyarsk, Russia;² Medical Clinic "AxioMed", Serpukhov, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: In today's world, an increasing number of people suffer from diseases associated with immune system dysfunctions, creating the need for new immunotherapy approaches. A promising direction is to elucidate the mechanism of action of aminodihydrophthalazinedione sodium (ADPS) on phagocytic immune cells, the main therapeutic targets of this compound. The mechanism is proposed to be studied at the cellular and subcellular levels using bioluminescent analysis methods.

AIM: This work aimed to investigate the mechanisms of ADPS (Tameron®) effects on neutrophil granulocyte metabolism *in vitro* in healthy individuals.

METHODS: 34 healthy women aged 23–33 years were examined. Bioluminescent determination of direct (NAD- and NADP-dependent) dehydrogenase activity in neutrophil granulocytes was performed according to our previously developed method using the biochemiluminescent analyzer BLM-3607 (MedBioTech LLC, Krasnoyarsk, Russia). Metabolic activity of neutrophil granulocytes was assessed under two conditions: experimental (with APDS) and control (without the compound).

RESULTS: Bioluminescent analysis demonstrated a decrease in NAD- and NADP-dependent dehydrogenase activity after 3 hours of incubation without APDS in healthy women. This indicates a slowdown of substrate flux through key metabolic pathways regulating anaerobic and aerobic energy metabolism and biosynthetic processes, leading to reduced functional activity of neutrophil granulocytes. Within the cytoplasmic compartment, reduced activity was observed in lipid anabolism reactions, glutathione-dependent antioxidant responses, anaerobic and aerobic lactate dehydrogenase reactions, as well as decreased substrate flow through the tricarboxylic acid cycle and inhibition of the key malate–aspartate shuttle reaction. When incubated with APDS, such significant changes in NAD-dependent dehydrogenase activity in neutrophil granulocytes were detected only after 24 hours of incubation.

CONCLUSION: *In vitro*, ADPS slows the depletion of cellular resources and delays the decline in metabolic activity and biocidal reactivity of neutrophil granulocytes.

Keywords: immunotherapy; neutrophil functional activity; NAD-dependent dehydrogenases; NADP-dependent dehydrogenases; bioluminescent analysis.

To cite this article:

Savchenko AA, Anisimova EN, Tsarkova EA, Borisov AG. Study of Aminodihydrophthalazinedione Sodium Mechanism of Action on the Metabolism of Neutrophilic Granulocytes *In Vitro*. *Cytokines and Inflammation*. 2024;21(4):213–220. DOI: 10.17816/CI685109 EDN: MBGOJG

ОБОСНОВАНИЕ

Современные эпидемиологические данные свидетельствуют о росте распространённости иммунопатологических состояний. Согласно прогностическим оценкам Всемирной организации здравоохранения [1, 2], к середине XXI века заболевания, связанные с нарушениями иммунной системы, могут занять лидирующую позицию в структуре общей заболеваемости, превывсив показатели сердечно-сосудистой патологии. Эта тенденция определяет необходимость разработки новых подходов к иммунотерапии, что представляет собой значимую медико-биологическую проблему.

Особый научный и практический интерес вызывает препарат аминодигидрофталазиндиона натрия (5-амино-1,2,3,4-тетрагидрофталазин-1,4-диона натриевая соль, АДНФ, Тамерон®), обладающий уникальным механизмом противовоспалительного действия [3–6]. Экспериментальные данные свидетельствуют о его способности модулировать цитокиновый профиль (снижать синтез TNF-фактора, IL-1 и других провоспалительных медиаторов), активировать систему антиоксидантной защиты через стабилизацию фактора Nrf2, оказывать избирательное воздействие на фагоцитарную активность. В результате происходит временное ингибирование фагоцитирующими клетками процессов синтеза РНК, ДНК и цитокинов (6–8 ч), усиление микробицидной системы фагоцитов, что предотвращает развитие интенсивного воспалительного процесса [7].

Важной особенностью АДНФ является его обратимый механизм действия, обеспечивающий временную супрессию гиперактивированных макрофагов без индукции стойких нарушений их физиологических функций. Препарат проявляет комплексное иммунотропное действие, характеризующееся стимуляцией фагоцитарной активности, усилением неспецифической резистентности организма, выраженными цитопротективными свойствами (предотвращение развития токсемических реакций и потенцирование антимикробных защитных механизмов).

Особого внимания заслуживает выраженный противовоспалительный профиль АДНФ, отличающийся от классических иммуностимуляторов, способных индуцировать провоспалительные осложнения, и нестероидных противовоспалительных средств и кортикостероидов, обладающих широким спектром нежелательных эффектов [8, 9].

Несмотря на клиническую эффективность препарата, остаются недостаточно изученными точные молекулярные механизмы его воздействия на фагоцитирующие клетки, реализуемые на клеточном и субклеточном уровнях организации и метаболические аспекты фармакологического действия. Исследование метаболических параметров приобретает особую значимость, поскольку именно метаболизм определяет функциональные возможности клеток и их чувствительность к регуляторным воздействиям [10–17].

В этом контексте методы биoluminesцентного анализа представляются наиболее перспективными благодаря высокой точности и воспроизводимости результатов, возможности оценки внутриклеточных процессов в реальном времени и применимости в клинической диагностической практике.

ЦЕЛЬ

Изучить механизмы влияния АДНФ на метаболизм нейтрофильных гранулоцитов *in vitro* у здоровых людей.

МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе клинического подразделения лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН в период с 06.04.2025 по 30.05.2025. Обследовано 34 женщины в возрасте 23–33 лет. Все пациентки прошли комплексное клиничко-лабораторное обследование, включавшее стандартный гинекологический осмотр, скрининг на инфекции, передающиеся половым путём, цитологическое исследование (мазков-отпечатков с шейки матки, соскобов из цервикального канала и прицельно взятых биопсийных образцов), и были признаны здоровыми. У всех обследованных осуществляли забор крови для последующего определения ферментативной активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах.

Выделение нейтрофильных гранулоцитов осуществляли по общепринятой методике на двойном градиенте плотности фиколл-верографина: $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ — для отделения лимфоцитов, $\rho=1,119 \text{ г/см}^3$ — для выделения нейтрофилов. Для удаления остатков эритроцитов осадок ресуспендировали в буфере для лизиса эритроцитов (0,83% раствор NH_4Cl в Tris-HCl-буфере, pH 7,2–7,4). Для контроля морфологического состава лейкоцитарной взвеси определяли чистоту выхода нейтрофилов (не менее 97%). Количество живых клеток оценивали по стандартной методике с использованием трипанового синего в камере Фукса–Розенталя. Клетки инкубировали (без и с АДНФ) в питательной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия).

Методы исследования активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов

Для оценки метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов были разработаны и применены оригинальные биoluminesцентные методики определения активности следующих ферментов:

- глутатионредуктазы (ГР);
- глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ);
- глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ);
- малик-фермента (НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа, НАДФ-МДГ);

- лактатдегидрогеназы (ЛДГ) — НАД- и НАДН-зависимые реакции;
- МДГ — НАДН-зависимые формы;
- глутаматдегидрогеназы (ГДГ) — НАД- и НАДН-зависимые формы;
- изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) — НАД- и НАДФ-зависимые формы;
- ГДГ — НАДФ- и НАДФН-зависимые формы.

Для проведения анализа клеточный лизат получали методом осмотического лизиса лимфоцитов в присутствии $1,5 \times 10^{-3}$ М дитиотреитола. Инкубационную смесь готовили из соответствующего субстрата в концентрации 10^{-5} – 10^{-2} М и кофермента в концентрации 10^{-6} – 10^{-2} М в 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатном или Tris-HCl-буфере (рН 7,0–10,0).

Реакционная смесь включала:

- 50 мкл 0,0005% раствора миристинового альдегида;
- 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М;
- 50 мкл биферментного комплекса НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза;
- 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатный буфер (рН 7,0).

Все компоненты реакционной смеси разводили в 0,1 М K^+ , Na^+ -фосфатном буфере (рН 7,0). К 150 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл клеточного лизата. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем добавляли реакционную смесь, перемешивали и измеряли интенсивность свечения с помощью биохемилюминесцентного анализатора БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», г. Красноярск).

Статистический анализ

В ходе исследования в MS Excel 2019 была создана база данных. Для анализа использовали программу Statistica 10. Описательная статистика включала медиану (Me) и интерквартильный размах (25–75-й процентиля). Группы сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Значимость различий в динамике инкубации клеток с АДФН проверяли по критерию Уилкоксона. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов в контроле (без АДФН) обнаружено, что через 1 ч процент живых клеток в среднем составил 98,2%, через 3 ч — 85,1%, через 24 ч — менее 50%. Данная динамика определяется несколькими факторами. Во-первых, нейтрофильные гранулоциты являются относительно короткоживущими клетками. Во-вторых, в процессе своей жизнедеятельности данный тип клеток продуцирует различные токсичные вещества (в том числе активные формы кислорода и азота), которые также воздействуют и на мембрану самих нейтрофильных гранулоцитов. В связи с этим мы максимально уменьшили количество клеток в инкубационной пробе — до 2 млн/мл (для дальнейшего проведения биолюминесцентного

анализа). Через 24 ч инкубации мы не проводили биолюминесцентный анализ в контрольной постановке (по причине низкого процента жизнеспособных нейтрофильных гранулоцитов).

При исследовании уровней активности НАД-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах в контроле обнаружено, что статистически значимые изменения фиксируются на 3-м часу инкубации (табл. 1). Так, через 3 ч инкубации в клетках снижается активность ЛДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ, НАДН-ЛДГ и НАДН-МДГ. Причём статистическая значимость изменений активности указанных ферментов определялась не только относительно контрольного уровня (контроль), но и активности ферментов, выявленных через 1 ч инкубации.

При исследовании уровней активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов в контроле обнаружены аналогичные вышеуказанным изменения: статистически значимое снижение активности Г6ФДГ, НАДФ-МДГ и ГР выявлены через 3 ч инкубации (табл. 2). Кроме того, статистическая значимость определяется как относительно контрольного уровня, так и уровня, выявленного через 1 ч инкубации.

Результаты биолюминесцентного исследования активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ показывают снижение интенсивности потока субстратов по основным метаболическим путям и циклам, которые регулируют уровни аэробной и анаэробной энергетики клеток, а также их пластические процессы. Это, в свою очередь, уменьшает функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов.

При исследовании жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов при инкубации с АДФН обнаружено значительное повышение процента живых клеток по сравнению с контролем. Через 1 ч инкубации он составил 98,9%, через 3 ч — 96,7% и через 24 ч — 93,6%. В связи с этим мы исследовали метаболическую активность нейтрофильных гранулоцитов при инкубации с АДФН на всём протяжении инкубационного периода (1, 3 и 24 ч).

В ходе изучения активности НАД-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов обнаружено, что статистически выраженные изменения выявляются только через 24 ч инкубации с АДФН (табл. 3). Эти изменения определяются значительным снижением активности ЛДГ, МДГ, НАД-ИЦДГ и НАДН-ЛДГ относительно исходного уровня (контроль) и выявленного через 1 и 3 ч инкубации. Активность НАДН-МДГ в нейтрофильных гранулоцитах при инкубации с АДФН статистически значимо снижается через 24 ч относительно исходного уровня и выявленного через 1 ч инкубации.

Подобные результаты получены и при исследовании активности НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов. Установлено, что статистически выраженные изменения обнаруживаются через 24 ч инкубации с АДФН (табл. 4). На этом периоде инкубации статистически значимо снижается активность МДГ и ГР

Таблица 1. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых женщин в динамике контрольной инкубации (Me, C25–C75)
Table 1. Activity of NAD-dependent dehydrogenases in neutrophil granulocytes of healthy women during control incubation (Me, C25–C75)

Показатели	Контроль		Через 1 ч		Через 3 ч		Через 24 ч	
	1		2		3		4	
	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75
ГЗФДГ	0,33	0,01–2,64	0,36	0,01–2,89	0,41	0,01–3,05	—	—
ЛДГ	28,66	2,36–107,34	22,61	3,14–98,47	4,69	0,01–15,47	—	—
$p_{1,2} < 0,01$								
МДГ	23,98	8,45–63,83	18,99	7,63–62,44	11,47	3,45–41,08	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАД-ГДГ	1,71	0,01–29,41	2,16	0,01–28,26	1,99	0,01–27,62	—	—
НАД-ИЦДГ	5,25	0,09–38,64	6,12	1,01–37,99	2,78	0,01–7,51	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДН-ЛДГ	8,70	0,01–47,91	7,99	0,01–48,34	4,32	0,01–17,42	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДН-МДГ	132,48	70,47–202,89	124,12	69,75–200,69	56,48	24,04–98,25	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДН-ГДГ	7,78	0,01–42,83	6,45	0,01–34,50	7,01	0,01–36,82	—	—

Примечание. ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; МДГ — малатдегидрогеназа; НАД-ГДГ — никотинамидадениндинуклеотид-зависимая глутаматдегидрогеназа; НАД-ИЦДГ — никотинамидадениндинуклеотид-зависимая изоцитратдегидрогеназа; НАДН-ЛДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой лактатдегидрогеназы; НАДН-МДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой малатдегидрогеназы; НАДН-ГДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой глутаматдегидрогеназы.

Таблица 2. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых женщин в динамике контрольной инкубации (Me, C25–C75)
Table 2. Activity of NADP-dependent dehydrogenases in neutrophil granulocytes of healthy women during control incubation (Me, C25–C75)

Показатели	Контроль		Через 1 ч		Через 3 ч		Через 24 ч	
	1		2		3		4	
	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75
Г6ФДГ	3,70	0,47–17,38	3,89	0,52–18,44	1,45	0,01–12,33	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДФ-МДГ	5,91	0,01–39,25	4,58	0,01–33,59	1,33	0,01–16,99	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДФ-ГДГ	0,04	0,01–1,71	0,11	0,01–2,15	0,08	0,01–1,87	—	—
НАДФ-ИЦДГ	17,71	4,04–74,31	16,55	3,68–72,48	17,01	2,98–65,22	—	—
ГР	12,64	3,80–54,23	10,28	2,13–50,67	4,32	0,01–8,77	—	—
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДФН-ГДГ	48,76	10,53–109,25	39,78	9,62–99,18	40,12	10,23–100,45	—	—

Примечание. ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; НАДФ-МДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая малатдегидрогеназа; НАДФ-ГДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая глутаматдегидрогеназа; НАДФ-ИЦДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая изоцитратдегидрогеназа; ГР — глутатионредуктаза; НАДФН-ГДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимой глутаматдегидрогеназы.

как относительно исходного уровня, так и уровней, выявленных через 1 и 3 ч инкубации.

Анализ результатов биolumинесцентного анализа позволяет отметить следующее. Обнаруженные через 24 ч инкубации с АДФН изменения уровней активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ нейтрофильных гранулоцитов у здоровых женщин соответствуют тем, что выявлялись через 3 ч при контрольной инкубации без препарата. В цитоплазматическом компартменте нейтрофильных гранулоцитов наблюдается снижение ключевой реакции липидного

Таблица 3. Активность НАД-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых женщин в динамике инкубации с аминоксигидрофталазиндионом натрия (Me, C25–C75)
Table 3. Activity of NAD-dependent dehydrogenases in neutrophil granulocytes of healthy women during incubation with sodium aminodihydrophthalazinedione (Me, C25–C75)

Показатели	Контроль		Через 1 ч		Через 3 ч		Через 24 ч	
	1		2		3		4	
	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75
ГЗФДГ	0,33	0,01–2,64	0,28	0,01–2,15	0,36	0,01–2,48	0,37	0,01–2,56
ЛДГ	28,66	2,36–107,34	26,78	1,99–98,56	34,45	2,47–100,62	8,79	0,01–25,00
$p_{1-3} < 0,05$								
МДГ	23,98	8,45–63,83	20,69	7,26–62,57	21,45	8,21–67,42	7,21	0,01–25,38
$p_{1-3} < 0,05$								
НАД-ГДГ	1,71	0,01–29,41	1,85	0,01–30,42	1,68	0,01–28,67	1,96	0,01–29,55
НАД-ИЦДГ	5,25	0,09–38,64	5,43	0,08–34,88	5,27	0,09–35,12	1,62	0,01–14,70
$p_{1-3} < 0,05$								
НАДН-ЛДГ	8,70	0,01–47,91	9,48	0,04–46,62	10,12	0,05–38,79	1,34	0,01–12,64
$p_{1-3} < 0,01$								
НАДН-МДГ	132,48	70,47–202,89	120,87	68,78–200,14	100,64	52,99–194,56	50,11	14,78–68,79
$p_{1,2} < 0,05$								
НАДН-ГДГ	7,78	0,01–42,83	7,15	0,01–38,13	6,96	0,01–39,76	7,42	0,01–40,49

Примечание. ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; МДГ — малатдегидрогеназа; НАД-ГДГ — никотинамидадениндинуклеотид-зависимая глутаматдегидрогеназа; НАД-ИЦДГ — никотинамидадениндинуклеотид-зависимая изоцитратдегидрогеназа; НАДН-ЛДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой лактатдегидрогеназы; НАДН-МДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой малатдегидрогеназы; НАДН-ГДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотид-зависимой глутаматдегидрогеназы.

Таблица 4. Активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых женщин в динамике инкубации с аминоксигидрофталазиндионом натрия (Me, C25–C75)
Table 4. Activity of NADP-dependent dehydrogenases in neutrophil granulocytes of healthy women during incubation with sodium aminodihydrophthalazinedione (Me, C25–C75)

Показатели	Контроль		Через 1 ч		Через 3 ч		Через 24 ч	
	1		2		3		4	
	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75	Me	C25–C75
Г6ФДГ	3,70	0,47–17,38	3,89	0,25–16,59	3,45	0,48–18,47	2,58	0,26–11,06
НАДФ-МДГ	5,91	0,01–39,25	5,25	0,01–37,48	6,12	0,04–40,66	1,81	0,01–10,23
$p_{1-3} < 0,05$								
НАДФ-ГДГ	0,04	0,01–1,71	0,10	0,01–2,85	0,08	0,01–1,52	0,07	0,01–2,11
НАДФ-ИЦДГ	17,71	4,04–74,31	18,56	5,12–72,68	17,12	4,77–67,69	19,33	3,25–41,22
ГР	12,64	3,80–54,23	16,88	3,69–52,45	15,52	2,76–50,20	2,69	0,01–8,33
$p_{1-3} < 0,05$								
НАДФН-ГДГ	48,76	10,53–109,25	48,25	9,37–100,54	40,36	10,04–98,80	47,26	11,01–97,65

Примечание. ГЗФДГ — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; НАДФ-МДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая малатдегидрогеназа; НАДФ-ГДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая глутаматдегидрогеназа; НАДФ-ИЦДГ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимая изоцитратдегидрогеназа; ГР — глутатионредуктаза; НАДФН-ГДГ — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимой глутаматдегидрогеназы.

анаболизма (НАДФ-МДГ). Также падает активность глутатион-зависимой антиоксидантной защиты (из-за подавления ГР) и ферментов гликолиза — ЛДГ. Это указывает на снижение интенсивности анаэробного расщепления глюкозы и уменьшение образования пирувата, который используется в метаболической системе митохондриального компартмента

для поддержки аэробного дыхания клеток [19]. Соответственно, состояние митохондриального компартмента нейтрофилов характеризуется снижением уровня потока субстратов по циклу трикарбоновых кислот (низкая активность НАД-ИЦДГ и МДГ) и ингибированием ключевой реакции малат-аспартатного шунта (НАДН-МДГ).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты дают основания предполагать, что сохранение жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов в культуре поддерживается АДФН. Данный механизм реализуется посредством активации метаболических путей в цитоплазматическом компартменте (уровень активности ферментов через 3 ч инкубации соответствует исходному). Указанная метаболическая стимуляция, в свою очередь, обеспечивает функциональную сохранность митохондриального аппарата клеток.

Однако пролонгированная инкубация приводит к истощению внутриклеточных ресурсов, что проявляется значительным снижением активности ферментов основных метаболических процессов и, как следствие, прогрессирующим снижением жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов.

Интересно, что выявленный нами эффект АДФН не является уникальным для нейтрофилов. Полученные данные согласуются с работами, демонстрирующими наличие выраженного регуляторного влияния АДФН на функционально-метаболическую активность макрофагов, в частности на его способность модулировать провоспалительный ответ и усиливать антиоксидантную защиту. Под действием АДФН у макрофагов отмечается изменение морфометрических параметров, усиление метаболической активности и ускорение процессов созревания [20]. Таким образом, можно предположить, что АДФН выступает универсальным модулятором метаболизма клеток, механизм действия которого, по-видимому, направлен на поддержание их функциональной активности и жизнеспособности в условиях культивирования. Однако, как и в случае с макрофагами, эффект АДФН зависит от времени инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, инкубация нейтрофильных гранулоцитов здоровых женщин без препарата АДФН (Тамерон®) уже через 3 ч вызывает значительное истощение клеточных ресурсов, снижение интенсивности основных метаболических реакций, определяющих состояние клеточной энергетики и пластических процессов, понижение биоцидной реактивности и, соответственно, снижение жизнеспособности клеток. При инкубации нейтрофильных гранулоцитов с препаратом АДФН признаки истощения клеточных ресурсов наблюдаются только через 24 ч, при этом биоцидная активность клеток сохраняется, а уровень их выживаемости снижается незначительно.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. А.А. Савченко — определение концепции, проведение исследования; Е.Н. Анисимова — визуализация, написание черновика рукописи; Е.А. Царькова — проведение исследования; А.Г. Борисов — работа с данными, анализ данных, написание черновика рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено локальным комитетом по биоэтике ФИЦ КНЦ СО РАН НИИИ МПС (протокол № 11 от 13 ноября 2023 г.).

Согласие на публикацию. Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утверждённую в составе протокола исследования этическим комитетом.

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовал один внешний рецензент и один член редакционного совета.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: A.A. Savchenko: conceptualization, investigation; E.N. Anisimova: visualization, writing—original draft; E.A. Tsarkova: investigation; A.G. Borisov: data curation, formal analysis, writing—original draft. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: The study was approved by the Local Bioethics Committee of the Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute for Medical Problems in the North (Protocol No. 11, November 13, 2023).

Consent for publication: All participants provided written informed consent form approved by the Ethics Committee as part of the study protocol prior to inclusion in the study.

Funding source: No funding.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, and no new data was collected or created.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved an external reviewer and a member of the editorial council.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Kasparov EV, Savchenko AA, Kudlai DA, et al. *Clinical immunology. Rehabilitation of the immune system*. Krasnoyarsk: Versona; 2022. 196 p. (In Russ.) ISBN: 978-5-906477-40-8 EDN: XMNDAQ
2. Kozlov VA, Tikhonova EP, Savchenko AA, et al. *Clinical immunology. A practical handbook for infection specialists*. Krasnoyarsk: Polikor; 2021. 550 p. (In Russ.) ISBN: 978-5-94285-235-1 doi: 10.17513/np.518
3. Ermakov AM, Gorlo OP, Krasnova YuV, et al. On approaches to obtaining high-purity sodium salt of luminol (3-aminophthalhydrazide sodium, 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione sodium)—the basis for drug Tameron. *Izvestiya Instituta inzhenernoi fiziki*. 2022;(1(63)):104–105. EDN: BFDRRP
4. Krasnova YV, Chistyakova AV. Medicine "Tameron®" standardization by IR-spectrometric. *Izvestiya Instituta inzhenernoi fiziki*. 2023;(1(67)):89–91. EDN: UDSKMU
5. Maevsky EI, Bogdanova LA, Kosyakova NI. Possible pathogenetic rationale for the treatment of post-COVID syndrome. *Izvestiya Instituta inzhenernoi fiziki*. 2023;(2(68)):107–112. EDN: MJALYJ
6. Tsarkova E, Filippova K, Afanasyeva V, et al. A study on the planarian model confirms the antioxidant properties of Tameron against X-ray- and menadione-induced oxidative stress. *Antioxidants*. 2023;12(4):953. doi: 10.3390/antiox12040953 EDN: CMQBEZ
7. Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 2010;15(10):7266–7291. doi: 10.3390/molecules15107266
8. Ermakov AM, Tzar'kova EA. On the antioxidant activity of the drug "Tameron". *Izvestiya Instituta inzhenernoi fiziki*. 2020;(3(57)):103–106. EDN: XPKUUH
9. Tzar'kov AN, Krasnova YuV, Tzar'kova EA. The production technology of the innovative immunotropic drug "Tameron". *Izvestiya Instituta inzhenernoi fiziki*. 2020;(2(56)):82–86. EDN: GCSFDZ
10. Kurtasova LM, Savchenko AA, Shkapova EA. *Clinical aspects of functional disorders of neutrophilic granulocytes in oncopathology*. Novosibirsk: Nauka Publishers; 2009.183 p. (In Russ.) EDN: RVYVRT
11. Savchenko AA, Borisov AG. *Fundamentals of Clinical Immunometabolomics*. Novosibirsk: Nauka Publishers; 2012. 263 p. (In Russ.) ISBN: 975-5-02-019117-4
12. Savchenko AA, Zdzitovetskiy DE, Borisov AG, Luzan NA. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2014;69(5–6):23–28. doi: 10.15690/vramn.v69i5-6.1039 EDN: SHNUSN
13. Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Borisov AG. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Russian journal of infection and immunity*. 2017;7(4):327–340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340 EDN: YNSRGI
14. Rossiev DA, Savchenko AA, Shakina NA. Neural network—classification of patients with virus hepatitis B, based on the value of immune parameters of blood and activities of metabolic enzymes of lymphocytes. *Journal of New Medical Technologies*. 1998;5(1):102–105. Available from: <http://vnmt.ru/Archive/1998n1-2.htm>
15. Savchenko AA, Shakina NA, Kurtasova LM. Immunological detection of blood and blood metabolic and hepatitis parameters A и B. *Zhurnal infektsionnoi patologii*. 1997;4(4):24–27. (In Russ.)
16. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):553–565. doi: 10.1038/nri.2016.70 EDN: WQDBZR
17. Stathopoulou C, Nikoleri D, Bertsias G. Immunometabolism: an overview and therapeutic prospects in autoimmune diseases. *Immunotherapy*. 2019;11(9):813–829. doi: 10.2217/imt-2019-0002
18. Savchenko AA. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent methods. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;159(5):692–695. EDN: TSGIFN
19. Savchenko AA, Kudlai DA, Kudryavtsev IV, et al. *Technologies for the diagnosis and correction of immunometabolic disorders. Clinical immunology for practicing physicians*. Krasnoyarsk: AS-KIT; 2023. 454 p. (In Russ.) ISBN: 978-5-605-04781-0 EDN: GKWRHR
20. Pozdina VA, Zvedeninova UV, Ulitko MV, et al. Immunophenotypic and morphometric evaluation of bone marrow macrophages culture stimulated with sodium aminodihydrophthalazinedione *in vitro*. *Tsitologiya*. 2021;63(5):449–459. doi: 10.31857/S0041377121050096 EDN: CIKLRY

ОБ АВТОРАХ

* **Анисимова Елена Николаевна**, канд. мед. наук, доцент;
адрес: Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3Г;
ORCID: 0000-0002-6120-159X;
eLibrary SPIN: 4610-7610;
e-mail: foi-543@mail.ru

Савченко Андрей Анатольевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0001-5829-672X;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Царькова Елена Александровна;
eLibrary SPIN: 5202-6035;
e-mail: service@axiomed.ru

Борисов Александр Геннадьевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-9026-2615;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

AUTHORS' INFO

* **Elena N. Anisimova**, MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor;
address: 3G Partizana Zheleznjaka st, Krasnoyarsk, Russia, 660022;
ORCID: 0000-0002-6120-159X;
eLibrary SPIN: 4610-7610;
e-mail: foi-543@mail.ru

Andrei A. Savchenko, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0001-5829-672X;
eLibrary SPIN: 3132-8260;
e-mail: aasavchenko@yandex.ru

Elena A. Tsarkova;
eLibrary SPIN: 5202-6035;
e-mail: service@axiomed.ru

Alexandr G. Borisov, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-9026-2615;
eLibrary SPIN: 9570-2254;
e-mail: 2410454@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author