

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci689629>

EDN: SRYHRQ



Влияние лактата *in vitro* на состояние фагоцитарной и хемилюминисцентной активности нейтрофилов при сепсисе

Е.В. Савченко¹, Р.Н. Борисов², С.А. Борисов¹

¹ Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

² Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Функциональное состояние нейтрофилов играет ключевую роль в патогенезе сепсиса, однако влияние лактата на их фагоцитарную активность и продукцию активных форм кислорода (АФК) остаётся недостаточно изученным. Существующие данные ограничиваются общими представлениями о воздействии лактата на иммунную систему, тогда как сведения о реакции нейтрофилов пациентов с сепсисом на *in vitro* нагрузку лактатом практически отсутствуют.

Цель исследования. Изучить влияние лактата *in vitro* на фагоцитоз и продукцию АФК нейтрофилами у септических пациентов.

Методы. В исследование включены пациенты с подтверждённым сепсисом ($n=28$) и здоровые добровольцы ($n=18$). Забор крови проводили в 1-е сутки после госпитализации и подтверждения диагноза. Активность фагоцитоза незрелых и зрелых нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии. Уровень продукции АФК нейтрофилами определяли с помощью хемилюминесцентного анализа. Все исследования выполняли по стандартному протоколу (контроль) и при *in vitro* нагрузке лактатом.

Результаты. В контрольных условиях фагоцитарный индекс зрелых нейтрофилов не различался между здоровыми донорами и пациентами с сепсисом, однако средний уровень флуоресценции был выше у септических пациентов. Лактат умеренно повышал фагоцитарный индекс у больных, не изменяя показатели контроля, при этом уровень флуоресценции сохранялся повышенным. Незрелые гранулоциты демонстрировали аналогичную закономерность. Спонтанная и индуцированная люцигенин- и люминол-зависимая хемилюминесценция у пациентов с сепсисом характеризовалась увеличением времени выхода на максимум, снижением интенсивности и площади под кривой, что отражает угнетение нейтрофильной функции. Лактат дополнительно увеличивал время выхода на максимум.

Заключение. При сепсисе нейтрофилы сохраняют фагоцитарную активность (независимо от степени зрелости), однако развитие респираторного взрыва замедлено. Лактат *in vitro* усиливает фагоцитоз, практически не влияя на генерацию АФК, что свидетельствует о его избирательном влиянии на функции нейтрофилов и возможности индукции воспалительной активности при ингибировании механизмов завершённого фагоцитоза.

Ключевые слова: сепсис; нейтрофилы; хемилюминесценция; фагоцитоз; лактат; проточная цитометрия; активные формы кислорода.

Как цитировать:

Савченко Е.В., Борисов Р.Н., Борисов С.А. Влияние лактата *in vitro* на состояние фагоцитарной и хемилюминисцентной активности нейтрофилов при сепсисе // Цитокины и воспаление. 2025. Т. 22, № 2. С. 69–78. DOI: 10.17816/Ci689629 EDN: SRYHRQ

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI689629>

EDN: SRYHRQ

Effect of *In Vitro* Lactate Exposure on Phagocytic and Chemiluminescent Activity of Neutrophils in Sepsis

Ekaterina V. Savchenko¹, Roman N. Borisov², Sergey A. Borisov¹¹ Krasnoyarsk Science Centre of the Siberian Branch of Russian Academy of Science — Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;² Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The functional state of neutrophils plays a key role in the pathogenesis of sepsis; however, the effect of lactate on their phagocytic activity and the production of reactive oxygen species (ROS) remains insufficiently studied. Current data are limited to general concepts regarding the impact of lactate on the immune system, whereas information on the response of neutrophils from patients with sepsis to *in vitro* lactate exposure is scarce.

AIM: This work aimed to investigate the effect of *in vitro* lactate exposure on phagocytosis and ROS production by neutrophils in patients with sepsis.

METHODS: The study included patients with confirmed sepsis ($n = 28$) and healthy volunteers ($n = 18$). Blood samples were collected on the first day after hospitalization and diagnostic confirmation. The phagocytic activity of immature and mature neutrophils was assessed by flow cytometry. ROS production was evaluated using chemiluminescence analysis. All experiments were performed under standard conditions (control) and with *in vitro* lactate exposure.

RESULTS: Under control conditions, the phagocytic index of mature neutrophils did not differ between healthy donors and patients with sepsis; however, the mean fluorescence intensity was higher in septic patients. Lactate moderately increased the phagocytic index in patients without affecting control values, whereas the elevated fluorescence level persisted. Immature granulocytes demonstrated a similar pattern. Spontaneous and stimulated lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence in patients with sepsis were characterized by a prolonged time to peak, reduced intensity, and a smaller area under the curve, indicating suppression of neutrophil function. Lactate exposure further increased the time to peak.

CONCLUSION: In sepsis, neutrophils preserve phagocytic activity (regardless of maturation stage), but the respiratory burst is delayed. *In vitro* lactate exposure enhances phagocytosis with virtually no effect on ROS generation, suggesting its selective modulation of neutrophil functions and potential to promote inflammatory activity while attenuating the mechanisms of completed phagocytosis.

Keywords: sepsis; neutrophils; chemiluminescence; phagocytosis; lactic acid; flow cytometry; reactive oxygen species.

To cite this article:

Savchenko EV, Borisov RN, Borisov SA. Effect of *In Vitro* Lactate Exposure on Phagocytic and Chemiluminescent Activity of Neutrophils in Sepsis. *Cytokines and Inflammation*. 2025;22(2):69–78. DOI: 10.17816/CI689629 EDN: SRYHRQ

ОБОСНОВАНИЕ

На сегодняшний день сепсис остаётся одной из ведущих причин госпитальной смертности и представляет собой тяжёлое системное заболевание, возникающее в ответ на инфекцию и характеризующееся нарушением регуляции иммунного ответа, что влечёт за собой общее нарушение функций органов [1]. По данным глобального исследования, ежегодно в мире регистрируется свыше 48 млн случаев сепсиса, из которых около 11 млн заканчиваются летальным исходом [2]. Несмотря на то что подход в лечении сепсиса остаётся консервативным, всё больше внимания уделяется исследованиям молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза заболевания, на основе которых разрабатываются новые подходы к лечению. Такие механизмы, в частности, включают регуляцию иммунного ответа, метаболизм лактата и ряда других патогенных метаболитов [1].

Важную роль в возникновении и развитии сепсиса играют клетки врождённого иммунитета — нейтрофилы. Они первыми мигрируют в зону воспаления, где осуществляют фагоцитоз, генерацию активных форм кислорода (АФК), а также формирование внеклеточных ловушек (NETs), что способствует уничтожению микроорганизмов [3, 4]. В процессе активации они усиливают как продукцию АФК, так и фагоцитарную активность, а также активно участвуют в локальной и системной регуляции воспаления. Однако избыточная и/или длительная активация нейтрофилов может приводить к повреждению тканей и развитию полиорганной недостаточности [4].

Особый интерес в изучении молекулярных механизмов развития сепсиса вызывает лактат, который является не только метаболическим маркером заболевания, но и активным регулятором иммунного ответа [5, 6]. При сепсисе концентрация лактата в периферической крови повышается, что может быть обусловлено тканевой гипоксией, а также митохондриальной дисфункцией, что приводит к активации анаэробного гликолиза как основного пути энергообеспечения. Однако лактат может непосредственно влиять на функции иммунных клеток, в частности нейтрофилов. В связи с тем, что он одновременно является и метаболитом, и эпигенетическим фактором, лактат способен регулировать внутриклеточное и внеклеточное pH, подавлять или усиливать продукцию АФК, а также влиять на фагоцитарную активность [7].

Таким образом, исследование влияния лактата на функциональную активность нейтрофилов позволит лучше понять взаимосвязь между патологическими регуляторными процессами и состоянием врождённого иммунитета. В контексте изучения сепсиса это особенно актуально, так как нарушение иммунной регуляции приводит к неблагоприятным исходам течения заболевания.

ЦЕЛЬ

Изучить влияние лактата *in vitro* на фагоцитоз и продукцию АФК нейтрофилами у септических пациентов.

МЕТОДЫ

На базе Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича в период с 06.11.2024 по 30.06.2025 были обследованы больные с подтверждённым диагнозом сепсиса ($n=28$, средний возраст пациентов — 54 года). Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности устанавливали по шкале SOFA [8]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [9]. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-е сутки госпитализации. В качестве контрольной группы ($n=18$) были обследованы практически здоровые добровольцы сопоставимого возрастного диапазона. Определение концентрации уровня лактата в сыворотке крови пациентов и доноров не проводили.

Выделение нейтрофильных гранулоцитов выполняли из цельной гепаринизированной крови путём центрифугирования с использованием двойного градиента плотности фиколл-урографина: $\rho=1,077$ г/см³ — для отделения лимфоцитов, $\rho=1,119$ г/см³ — для получения фракции нейтрофилов. Полученные в процессе клетки разводили в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) и разделяли на две пробы: контрольную и с добавлением лактата (1 mM L-Lactic acid sodium salt, Sigma-Aldrich, США). После инкубации клеток в течение 1-го часа при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) изучали фагоцитарную и хемилюминесцентную активность нейтрофилов.

Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов проводили с использованием метода проточной цитометрии с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), несущие флуоресцентные метки, PC7 (phycoerythrin-cyanin 7); APC (allophycocyanin); AF700 (Alexa Fluor 750). В качестве объекта фагоцитоза использовали FITC-меченный стафилококковый белок А. Количественную оценку степени фагоцитоза устанавливали путём измерения интенсивности флуоресценции с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США) [10].

В каждой пробе анализировали не менее 50 000 нейтрофилов. Полученные данные оценивали с помощью программного пакета Kaluza (Beckman Coulter, Inc., США). В основе протокола гейтирования лежит выделение фракции гранулоцитов на основании экспрессии CD14. Используя двухпараметровую гистограмму CD45/CD16, производили выделения популяций зрелых (CD45⁺CD16⁺) и незрелых нейтрофилов (CD45^{low}CD16^{low}). Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс — ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число — ФЧ).

Для оценки способности нейтрофилов продуцировать АФК применяли метод хемилюминесценции (ХЛ) с двумя детектирующими агентами — люминол и люцигенин (Sigma, США, концентрация 10⁻⁵ M) [11].

Регистрацию кинетики и уровня синтеза АФК проводили на 36-канальном хемилиуминометре CL3607 (ООО «МедБиоТех», Россия) в течение 90 мин. По результатам анализа кривой ХЛ рассчитывали: $I_{\max}$ — пиковую интенсивность свечения, $T_{\max}$ — время выхода на максимум, S — площадь под кривой, которая отражает общее количество синтезированных АФК. Для оценки интенсивности ХЛ, индуцированной зимозаном, рассчитывали индекс активации как отношение площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программного пакета Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США, 2013). Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1-го и 3-го квартилей (Q_1 и Q_3). Значимость различий между показателями независимых выборок (сравнение с показателями контрольной группы) оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Значимость различий между контрольными пробами и с лактатом определяли по критерию Уилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычисляли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании фагоцитарной активности в контрольных условиях (без добавления лактата) было обнаружено, что ФИ зрелых нейтрофилов ($CD45^+CD16^+$) не показал значимых различий между группами здоровых доноров и пациентов с сепсисом (рис. 1, *a*). Однако средний уровень флуоресценции фагоцитирующих клеток (ФЧ) был статистически значимо выше у пациентов с сепсисом (рис. 1, *b*).

Инкубация зрелых нейтрофилов с лактатом у лиц контрольной группы не приводила к изменению величины ФИ, тогда как у пациентов с сепсисом отмечали его умеренное, но статистически значимое снижение относительно исходных значений (рис. 1, *c*). При этом ФЧ в группе сепсиса сохраняло значительное повышение по сравнению с контролем (рис. 1, *d*).

Сходная закономерность была выявлена и для незрелых гранулоцитов ($CD45^{\text{low}}CD16^{\text{low}}$). Независимо от воздействия лактата, значения ФИ не различались между пациентами с сепсисом и контрольной группой (рис. 2, *a, c*). В то же время ФЧ у пациентов с сепсисом было значимо выше, чем у здоровых доноров, как в контрольных условиях, так и после инкубации с лактатом (рис. 2, *b, d*).

При исследовании особенностей ХЛ-активности нейтрофильных гранулоцитов было установлено, что у пациентов с сепсисом при спонтанной люцигенин-зависимой ХЛ время выхода на максимум значительно увеличивается по сравнению с контролем (рис. 3, *a*). При этом максимум интенсивности и площадь под кривой значимо снижаются, указывая на угнетение функции нейтрофилов (рис. 3, *b, c*). Инкубация с лактатом также показала значимое увеличение времени выхода на максимум у больных сепсисом (рис. 3, *d*), но при сниженной интенсивности и площади под кривой (рис. 3, *e, f*).

Индуцированная люцигенин-зависимая ХЛ у пациентов с сепсисом также характеризуется увеличенным временем выхода на максимум как в контрольных пробах, так и с лактатом (рис. 4, *a, d*). Максимум интенсивности и площадь под кривой при сравнении обеих групп не подтверждаются статистической значимостью (рис. 4, *b, c, e, f*).

Исследование спонтанной люминол-зависимой ХЛ также демонстрирует значимое увеличение времени

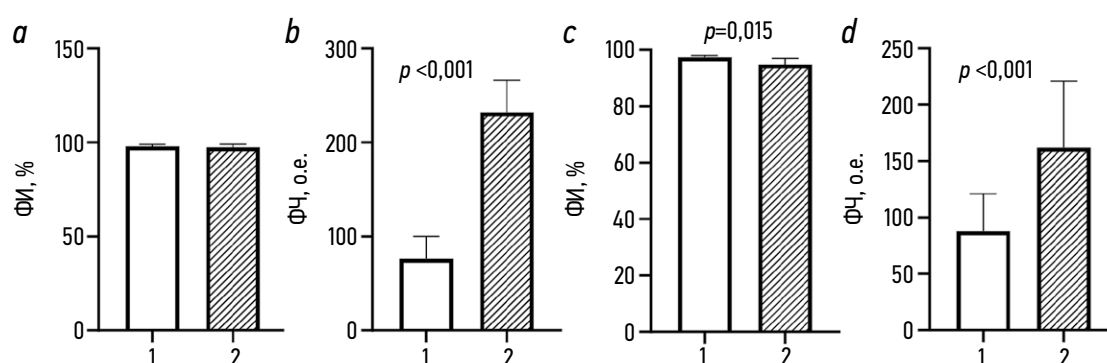


Рис. 1. Показатели фагоцитоза зрелых ($CD45^+CD16^+$) нейтрофилов у здоровых доноров и пациентов с сепсисом: *a–b* — контрольные условия; *c–d* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — фагоцитарный индекс; *b* — средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число); *c* — фагоцитарный индекс с нагрузкой лактатом; *d* — средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число) с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$), 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ФИ — фагоцитарный индекс; ФЧ — фагоцитарное число. Данные представлены как Me (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна-Уитни. Единицы измерения: фагоцитарный индекс — %, фагоцитарное число — усл. ед. (o. e.).

Fig. 1. Phagocytosis parameters of mature ($CD45^+CD16^+$) neutrophils in healthy donors and patients with sepsis: *a–b*, control conditions; *c–d*, incubation with lactate. Parameters: *a*, phagocytic index; *b*, mean cell fluorescence level (phagocytic number); *c*, phagocytic index under lactate load; *d*, mean cell fluorescence level (phagocytic number) under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n=18$); 2, patients with sepsis ($n=28$). ФИ, phagocytic index; ФЧ, phagocytic number. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis. Units: phagocytic index, %; phagocytic number, arbitrary units.

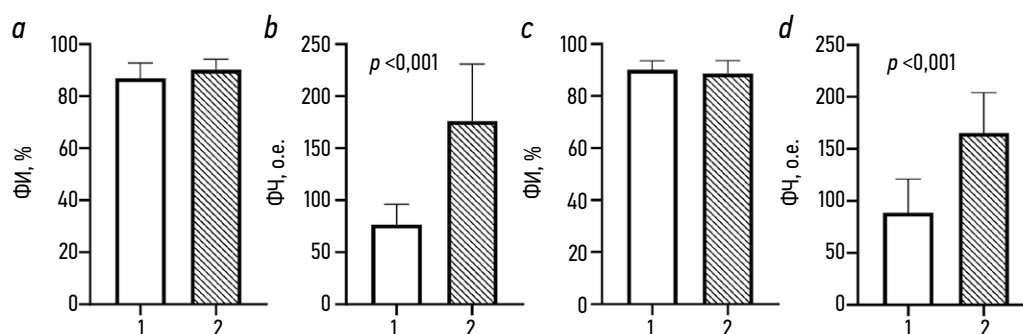


Рис. 2. Показатели фагоцитоза незрелых ($CD45^{\text{low}}CD16^{\text{low}}$) гранулоцитов у здоровых доноров и пациентов с сепсисом: *a–b* — контрольные условия; *c–d* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — фагоцитарный индекс; *b* — средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число); *c* — фагоцитарный индекс с нагрузкой лактатом; *d* — средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число) с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$); 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ФИ — фагоцитарный индекс; ФЧ — фагоцитарное число. Данные представлены как Ме (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна–Уитни. Единицы измерения: фагоцитарный индекс — %, фагоцитарное число — усл. ед. (о. е.).

Fig. 2. Phagocytosis parameters of immature ($CD45^{\text{low}}CD16^{\text{low}}$) granulocytes in healthy donors and patients with sepsis: *a–b*, control conditions; *c–d*, incubation with lactate. Parameters: *a*, phagocytic index; *b*, mean cell fluorescence level (phagocytic number); *c*, phagocytic index under lactate load; *d*, mean cell fluorescence level (phagocytic number) under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n = 18$); 2, patients with sepsis ($n = 28$). FI, phagocytic index; FC, phagocytic number. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis. Units: phagocytic index, %; phagocytic number, arbitrary units.

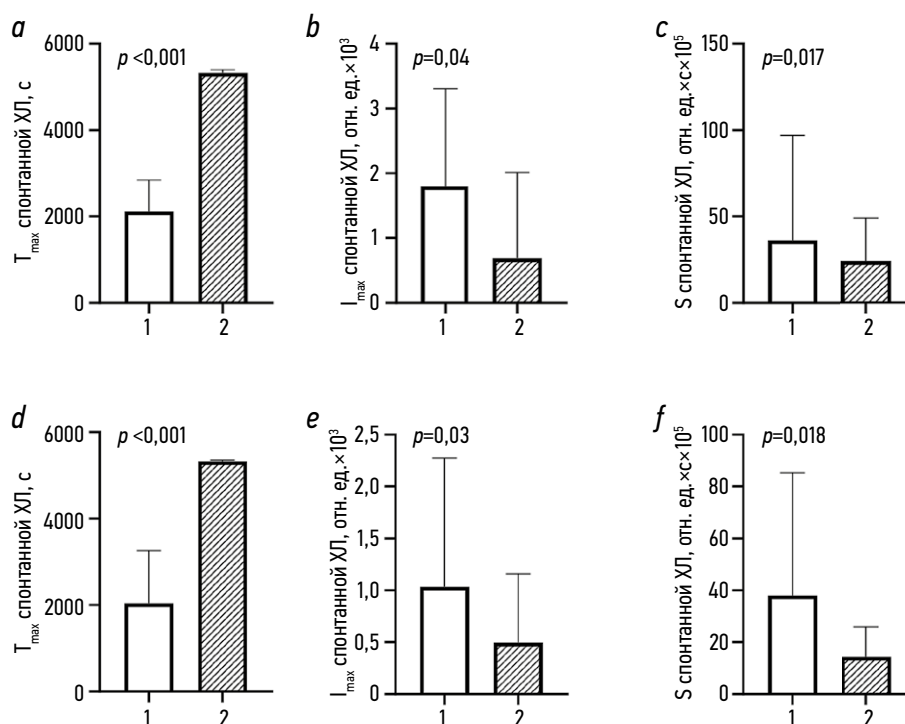


Рис. 3. Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у здоровых и пациентов с сепсисом: *a–c* — контрольные условия; *d–f* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции; *b* — максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции; *c* — площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции; *d* — время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом, *e* — максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *f* — площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$); 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ХЛ — хемилюминесценция; I_{max} — пиковая интенсивность свечения; T_{max} — время выхода на максимум; S — площадь под кривой. Данные представлены как Ме (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна–Уитни.

Fig. 3. Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils in healthy donors and patients with sepsis: *a–c*, control conditions; *d–f*, incubation with lactate. Parameters: *a*, time to peak of spontaneous chemiluminescence; *b*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence; *c*, area under the spontaneous chemiluminescence curve; *d*, time to peak of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *e*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *f*, area under the spontaneous chemiluminescence curve under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n = 18$); 2, patients with sepsis ($n = 28$). ХЛ, chemiluminescence; I_{max} , peak luminescence intensity; T_{max} , time to peak; S, area under the curve. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis.

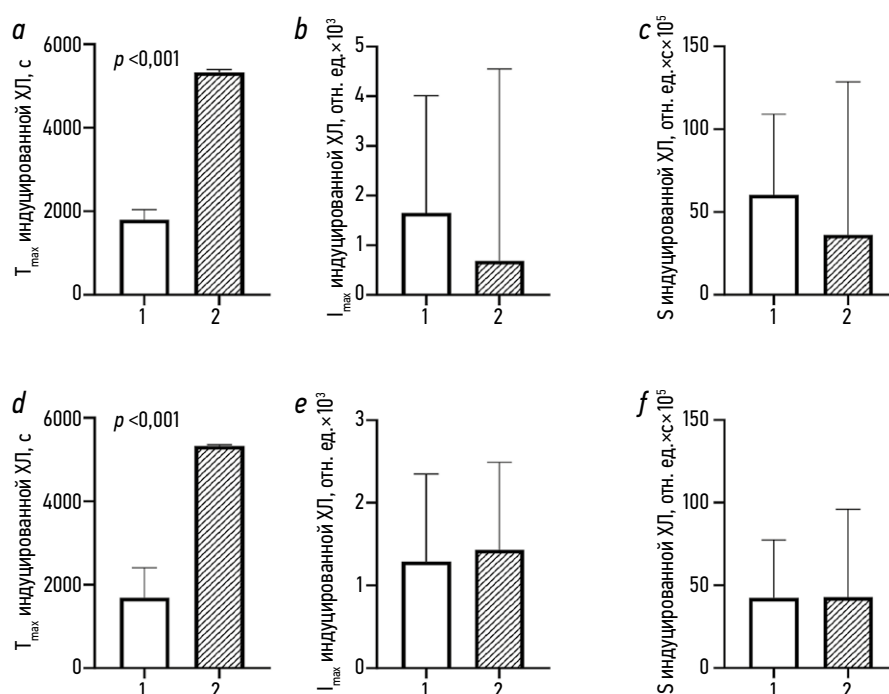


Рис. 4. Индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у здоровых и пациентов с сепсисом: *a–c* — контрольные условия; *d–f* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — время выхода на максимум индуцированной хемилюминесценции; *b* — максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции; *c* — площадь под кривой спонтанной ХЛ; *d* — время выхода на максимум индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *e* — максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *f* — площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$); 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ХЛ — хемилюминесценция; I_{max} — пиковая интенсивность свечения; T_{max} — время выхода на максимум; S — площадь под кривой. Данные представлены как Ме (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна–Уитни.

Fig. 4. Induced lucigenin-dependent chemiluminescence of neutrophils in healthy donors and patients with sepsis: *a–c*, control conditions; *d–f*, incubation with lactate. Parameters: *a*, time to peak of spontaneous chemiluminescence; *b*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence; *c*, area under the spontaneous chemiluminescence curve; *d*, time to peak of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *e*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *f*, area under the spontaneous chemiluminescence curve under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n=18$); 2, patients with sepsis ($n=28$). ХЛ, chemiluminescence; I_{max} , peak luminescence intensity; T_{max} , time to peak; S , area under the curve. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis.

выхода на максимум у пациентов с сепсисом по сравнению со здоровыми донорами (рис. 5, *a*). Однако максимум интенсивности и площадь под кривой (без добавления лактата) выше у контрольной группы (рис. 5, *b, c*). После воздействия лактата различия по данным параметрам сохраняются и усиливаются (рис. 5, *d–f*).

Индуцированная люминол-зависимая ХЛ также сопровождается увеличением времени выхода на максимум у септических пациентов как при контрольных условиях, так и при инкубации с лактатом (рис. 6, *a, d*). Максимум интенсивности и площадь под кривой у пациентов с сепсисом ниже, чем у контрольной группы, при этом статистически значимые различия подтверждены только в контроле без лактата (рис. 5, *b, c, e, f*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде ранее проведённых исследований показано, что функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов при сепсисе меняется [12, 13]. В нашем

исследовании также обнаружены изменения функциональных механизмов нейтрофилов у обследованных пациентов с сепсисом, проявляющиеся в подавлении синтеза АФК при сохранении фагоцитарной активности зрелых нейтрофилов.

Современные исследования подтверждают, что фагоцитоз незрелых форм нейтрофилов всегда остаётся неполноценным по сравнению со зрелыми: они демонстрируют пониженную опсонизацию, снижение выработки АФК и, как следствие, менее эффективное уничтожение патогенов. Особенно важно учитывать это в контексте сепсиса, когда на фоне экстренного гранулопозеза в кровоток поступает большое количество незрелых нейтрофилов, не способных в полной мере компенсировать функции зрелых нейтрофилов [14].

Отсутствие изменений фагоцитарного индекса зрелых нейтрофилов при повышении среднего уровня флуоресценции у пациентов с сепсисом может свидетельствовать о том, что общее количество фагоцитирующих клеток

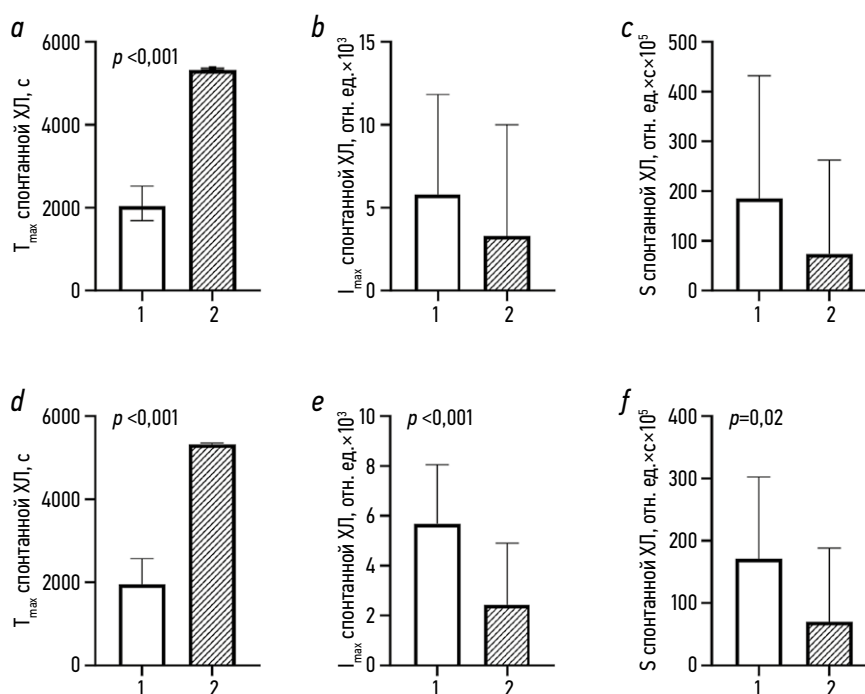


Рис. 5. Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у здоровых и пациентов с сепсисом: *a–c* — контрольные условия; *d–f* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции; *b* — максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции; *c* — площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции; *d* — время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *e* — максимум интенсивности спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *f* — площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$); 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ХЛ — хемилюминесценция; I_{max} — пиковая интенсивность свечения; T_{max} — время выхода на максимум; S — площадь под кривой. Данные представлены как Me (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна–Уитни.

Fig. 5. Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils in healthy donors and patients with sepsis: *a–c*, control conditions; *d–f*, incubation with lactate. Parameters: *a*, time to peak of spontaneous chemiluminescence; *b*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence; *c*, area under the spontaneous chemiluminescence curve; *d*, time to peak of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *e*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *f*, area under the spontaneous chemiluminescence curve under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n = 18$); 2, patients with sepsis ($n = 28$). ХЛ, chemiluminescence; I_{max} , peak luminescence intensity; T_{max} , time to peak; S, area under the curve. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis.

сохраняется, однако их функциональная активность усиливается, что объясняется компенсаторным механизмом, который запускается при воспалении. При этом обнаружено, что при добавлении лактата ФИ как у пациентов с сепсисом, так и у здоровых доноров увеличился по отношению к контрольным условиям, что подчёркивает регуляторное действие лактата [7]. При этом наши данные согласуются с ранее опубликованными результатами, показавшими что лактат способен модулировать функции нейтрофилов, включая образование внеклеточных нейтрофильных ловушек и энергетическое обеспечение воспаления [5, 6]. Исследование фагоцитарной активности незрелых гранулоцитов также продемонстрировало повышенный ФЧ у септических пациентов, что указывает на иммобилизацию молодых клеток из костного мозга для поддержания фагоцитарной активности в условиях воспаления. Эти клетки наравне со зрелыми нейтрофилами способны активно включаться в процесс фагоцитоза, но при этом имеют ограниченную способность

продуцировать АФК [15]. Несмотря на полученные результаты, демонстрирующие, что при сепсисе нейтрофильные гранулоциты сохраняют способность к фагоцитозу, они также подтверждают выраженные признаки нарушения функций окислительного метаболизма.

При анализе ХЛ-активности было обнаружено, что у пациентов с сепсисом как люцигенин-, так и люминол-зависимая ХЛ сопровождается увеличением T_{max} при снижении I_{max} и S, особенно в спонтанных реакциях. Это указывает на снижение активности НАДФН-оксидазы и ослабление как внутриклеточного, так и внеклеточного киллинга [11].

Добавление лактата оказывало разнонаправленное действие на функциональную активность нейтрофилов. У здоровых доноров инкубация с лактатом приводила к умеренному повышению фагоцитарной активности, при этом исходные характеристики продукции АФК сохранялись. У пациентов с сепсисом лактат также повышал активность фагоцитоза, однако генерация АФК была

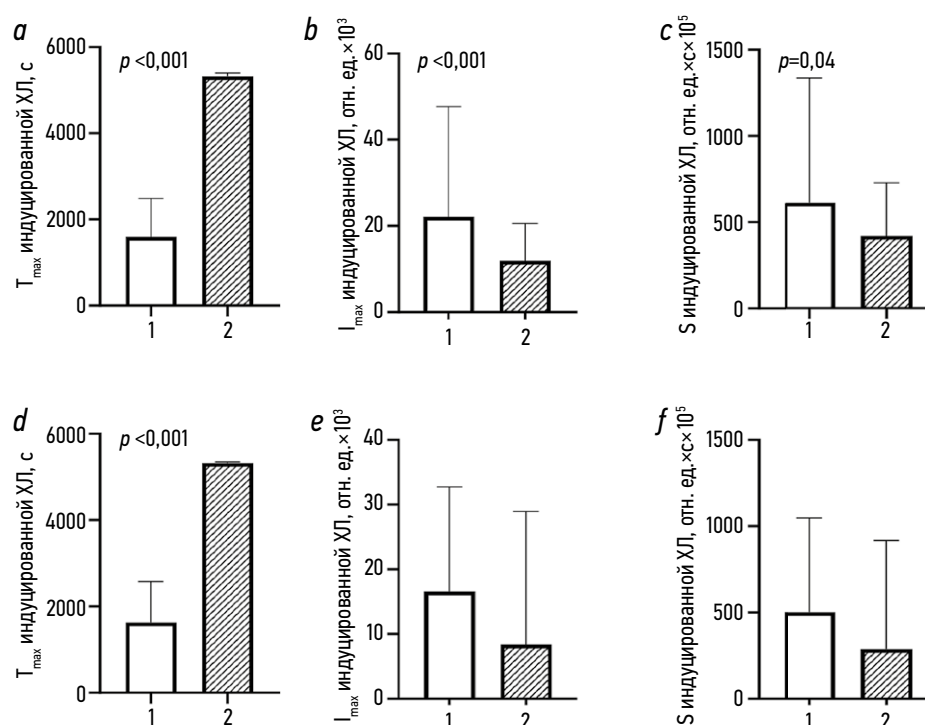


Рис. 6. Индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов у здоровых и пациентов с сепсисом: *a–c* — контрольные условия; *d–f* — инкубация с лактатом. Показатели: *a* — время выхода на максимум индуцированной хемилюминесценции; *b* — максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции; *c* — площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции; *d* — время выхода на максимум индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *e* — максимум интенсивности индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом; *f* — площадь под кривой индуцированной хемилюминесценции с нагрузкой лактатом. 1 — контрольная группа (здоровые доноры, $n=18$); 2 — пациенты с сепсисом ($n=28$). ХЛ — хемилюминесценция; I_{max} — пиковая интенсивность свечения; T_{max} — время выхода на максимум; S — площадь под кривой. Данные представлены как Me (C25–C75). Для статистической обработки использован критерий Манна–Уитни.

Fig. 6. Induced luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils in healthy donors and patients with sepsis: *a–c*, control conditions; *d–f*, incubation with lactate. Parameters: *a*, time to peak of spontaneous chemiluminescence; *b*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence; *c*, area under the spontaneous chemiluminescence curve; *d*, time to peak of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *e*, peak intensity of spontaneous chemiluminescence under lactate load; *f*, area under the spontaneous chemiluminescence curve under lactate load. 1, control group (healthy donors, $n = 18$); 2, patients with sepsis ($n = 28$). ХЛ, chemiluminescence; I_{max} , peak luminescence intensity; T_{max} , time to peak; S , area under the curve. Data are presented as Me (C25–C75). The Mann–Whitney test was used for statistical analysis.

угнетена по сравнению с контрольными значениями, а в ряде случаев наблюдалось дополнительное замедление реакции. Таким образом, в группе пациентов с сепсисом фиксируется функциональный дисбаланс между поглощением и респираторным взрывом. Вероятной причиной является высокая доля незрелых гранулоцитов, способных активно фагоцитировать, но ограниченно продуцирующих АФК из-за незрелости ферментных систем, что приводит к незавершённому фагоцитозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с сепсисом нейтрофилы сохраняют фагоцитарную способность (независимо от степени зрелости), однако их окислительный метаболизм существенно нарушен, что проявляется замедлением развития респираторного взрыва и снижением генерации АФК.

При добавлении лактата *in vitro* отмечалось умеренное усиление фагоцитарной активности как у пациентов

с сепсисом, так и у здоровых доноров. При этом продукция АФК в группе сепсиса оставалась существенно сниженной, что отражает дисбаланс между поглощением и киллингом. Полученные данные демонстрируют, что стимуляция фагоцитоза не компенсирует нарушение респираторного взрыва, а лактат может выступать как потенциальный модулятор клеточного ответа, способный избирательно влиять на отдельные функциональные механизмы нейтрофилов, провоцируя развитие незавершённого фагоцитоза и стимулируя активность воспаления.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Е.В. Савченко — определение концепции, проведение исследования, работа с данными, визуализация, написание черновика рукописи; Р.Н. Борисов — пересмотр и редактирование рукописи, визуализация; С.А. Борисов — пересмотр и редактирование рукописи, визуализация. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все

аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Красноярского научного центра СО РАН (протокол № 10 от 28.10.2024). От участников получено письменное информированное согласие на использование биологического материала и данных в научных целях.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания № FWES-2024-0016 (регистрационный № 225020106474-5) «Исследование молекулярно-клеточных механизмов регуляции иммунного ответа и взаимодействия иммунной системы с другими системами организма у жителей Восточной Сибири».

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. Все данные представлены в статье.

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

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали член редакционной коллегии и член редакционного совета.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: E.V. Savchenko: conceptualization, investigation, data curation, visualization, writing—original draft, R.N. Borisov: writing—review & editing, visualization; S.A. Borisov: writing—review & editing, visualization. All the authors approved the manuscript and also agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring appropriate consideration and resolution of questions related to the accuracy and integrity of any part of it.

Ethics approval: The study was approved by the local Ethics Committee of the Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Minutes No. 10, dated October 28, 2024). Written informed consent was obtained from all participants for the use of biological material and data for research purposes.

Funding source: This work was part of state assignment No. FWES-2024-0016 (registration No. 225020106474-5), *Investigation of the molecular and cellular mechanisms regulating immune response and the interaction of the immune system with other body systems in residents of Eastern Siberia*.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with 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 article was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved a member of the editorial board a member of the editorial council.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med*. 2021;47(11):1181–1247. doi: 10.1007/s00134-021-06506-y EDN: QPJRSQ
2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the global burden of disease study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7 EDN: JGNMNL
3. Bhatia N, George B, Masih D, et al. Mechanistic insights into PAMP and DAMP driven activation of NETosis in autoimmune disorders. *Int Immunopharmacol*. 2025;162:115149. doi: 10.1016/j.intimp.2025.115149
4. Liu Z, Ting Y, Li M, et al. From immune dysregulation to organ dysfunction: understanding the enigma of sepsis. *Front Microbiol*. 2024;15:1415274. doi: 10.3389/fmicb.2024.1415274 EDN: UPVJSF
5. Zhang T, Chen L, Kueth G, et al. Lactate's impact on immune cells in sepsis: unraveling the complex interplay. *Front Immunol*. 2024;15:1483400. doi: 10.3389/fimmu.2024.1483400 EDN: KYWVYR
6. Llibre A, Kucuk S, Gope A, et al. Lactate: a key regulator of the immune response. *Immunity*. 2025;58(3):535–554. doi: 10.1016/j.immuni.2025.02.008 EDN: PDYZTB
7. Tahir MN, Wagner K, Hassan U. An assessment of machine learning methods to quantify blood lactate from neutrophils phagocytic activity. *Sci Rep*. 2025;15(1):6626. doi: 10.1038/s41598-025-90883-7 EDN: CXCMOX
8. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the European society of intensive care medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707–710. doi: 10.1007/bf01709751 EDN: FAEXTR
9. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. American college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644–1655. doi: 10.1378/chest.101.6.1644
10. Savchenko AA, Gvozdev II, Borisov AG, et al. Features of the phagocytic activity and respiratory burst state of blood neutrophils of patients with widespread purulent peritonitis in the dynamics of the postoperative period. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017;7(1):51–60. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-51-60 EDN: YHCVNH
11. Savchenko AA, Borisov AG, Modestov AA, et al. Phenotypic features and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in the patients with renal cancer. *Medical immunology (Russia)*. 2016;18(3):259–268. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-259-268 EDN: WENNFR
12. Yang X, Pu X, Zhao J, et al. An integrated microfluidic platform for label-free sorting and functional assessment of neutrophils in sepsis. *Anal Chem*. 2025;97(29):15949–15958. doi: 10.1021/acs.analchem.5c02565
13. Zhao Y, Qu Y, Huang C, et al. Neutrophils loaded NAD⁺ impede TLR4/NF-κB/NLRP3 pathway for sepsis treatment. *Mater Today Bio*. 2025;34:102168. doi: 10.1016/j.mtbio.2025.102168
14. Thind MK, Uhlig HH, Glogauer M, et al. A metabolic perspective of the neutrophil life cycle: new avenues in immunometabolism. *Front Immunol*. 2024;14:1334205. doi: 10.3389/fimmu.2023.1334205 EDN: JXVUPH
15. Kosyreva AM, Miroshnichenko EA, Makarova OV. The role of neutrophils in the mechanisms of sepsis. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2024;86(6):82–91. doi: 10.17116/ptol20248606182 EDN: EKBBJF

ОБ АВТОРАХ

*** Савченко Екатерина Вячеславовна;**

адрес: Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3Г;
ORCID: 0009-0005-2114-581X;
eLibrary SPIN: 7235-5987;
e-mail: sav-ka-00@mail.ru

Борисов Роман Николаевич, канд. мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-9670-9476;
eLibrary SPIN: 4606-7206;
e-mail: boron-5@yandex.ru

Борисов Сергей Александрович;

ORCID: 0000-0002-0449-5333;
eLibrary SPIN: 1903-8488;
e-mail: borisov1207@mail.ru

AUTHORS' INFO

*** Ekaterina V. Savchenko;**

address: 3G Partizan Geleznyak st, Krasnoyarsk, Russia, 660022;
ORCID: 0009-0005-2114-581X;
eLibrary SPIN: 7235-5987;
e-mail: sav-ka-00@mail.ru

Roman N. Borisov, MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0001-9670-9476;
eLibrary SPIN: 4606-7206;
e-mail: boron-5@yandex.ru

Sergey A. Borisov;

ORCID: 0000-0002-0449-5333;
eLibrary SPIN: 1903-8488;
e-mail: borisov1207@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author