

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

© 2023 г. Н.Д. Федорова^{*,#}, Д.А. Сумбатьян^{*}, А.В. Соколов^{**}, М.В. Филатов^{*},
А.П. Трашков^{*}, Е.Ю. Варфоломеева^{*}

^{*}Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», мкр. Орлова роща, 1, Гатчина, Ленинградская обл., 188300, Россия

^{**}Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376, Россия

[#]E-mail: fedorova_nd@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Нейтрофилы — ведущие клетки системы врожденного иммунитета и основная популяция лейкоцитов, отвечающая за первичную реакцию организма на различные инфекционные частицы. Последние уничтожаются нейтрофилами благодаря процессам фагоцитоза и каскада реакций, включающих реакцию респираторного взрыва. В результате реакции респираторного взрыва нейтрофилы продуцируют активные формы кислорода и галогенов, мощные цитотоксические агенты, разрушающие частицы в фаголизосоме. Все перечисленные процессы требуют регуляции, поскольку чрезмерная активация нейтрофилов может привести к опосредованному активными формами кислорода повреждению тканей, окружающих очаг воспаления. Белки острой фазы воспаления претендуют на роль регуляторов воспаления. Ранее нами было показано участие церулоплазмينا в ингибировании реакции респираторного взрыва нейтрофилов в образцах крови. Фибриноген, напротив, увеличивал интенсивность реакции респираторного взрыва. Не для всех белков острой фазы воспаления и особенно их комбинаций детально изучено влияние на функции нейтрофилов. В данной работе впервые исследовано влияние ряда белков острой фазы воспаления (С-реактивного белка, сыровороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина и фибриногена) на способность нейтрофилов периферической крови к реакции респираторного взрыва с помощью проточной цитометрии с регистрацией продукции активных форм кислорода в клетках в составе образцов периферической крови. Обнаружены достоверные изменения способности нейтрофилов к выработке активных форм кислорода для ряда комбинаций изученных белков острой фазы воспаления. Исследование взаимодействия церулоплазмينا и фибриногена с нейтрофилами периферической крови выявило их мембранную локализацию. Представляется перспективным идентифицировать рецепторы для белков острой фазы воспаления на мембране нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, белки острой фазы воспаления, реакция респираторного взрыва, цитометрия, конфокальная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302923030146, EDN: FRZBBU

Белки, синтез которых значимо изменяется в ответ на различные патологические процессы (воспаление, повреждение, злокачественные новообразования), а также во время беременности, называются белками острой фазы воспаления (БОФ). К этой группе относят белки, концентрация которых в плазме крови увеличивается на 25% и более в первые 7 суток воспалительного процесса. Повышение концентрации БОФ, как правило, обусловлено цитокинами, коррели-

рует с тяжестью течения воспалительного заболевания и его стадией. Поэтому БОФ используются в клинической практике как маркеры воспалительного процесса и повреждений, а также для отслеживания течения заболеваний и оценки эффективности лечения. Тем не менее, использование анализа БОФ для дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний ограничено из-за ряда проблем, в том числе неспецифичности и сложности сравнения результатов анализа БОФ с помощью подходов, основанных на различных видах антител либо реакциях, катализируемых БОФ.

Сокращения: БОФ — белки острой фазы воспаления, РРВ — реакция респираторного взрыва, СРБ — С-реактивный белок, САА — сыровороточный амилоид А, α1AGP — альфа-1-кислый гликопротеин.

Нейтрофилы, будучи клетками врожденного иммунитета, принимают активное участие в воспалительном процессе. Их основная роль заключается в миграции к месту повреждения или воспаления, захвате инфекционных частиц и их разрушении. Долгое время считалось, что преимущественной функцией нейтрофилов является фагоцитоз, в процессе которого активированный нейтрофил поглощает патоген, а затем разрушает его, высвобождая в фаголизосому активные формы кислорода и различные протеолитические ферменты [1–3]. Активные формы кислорода образуются НАДФН-оксидазным комплексом после активации нейтрофила посредством каскада реакций, известного как реакция респираторного взрыва (РРВ) [4–7]. Процесс активации нейтрофила включает стадию праймирования [8]. На этой стадии нейтрофил претерпевает ряд функциональных изменений, взаимодействуя с разнообразными праймирующими агентами, список которых постоянно пополняется. Одним из таких функциональных изменений является изменение способности нейтрофила к выработке активных форм кислорода, что крайне важно для эффективного уничтожения патогенов.

Известно, что функциональная активность нейтрофилов периферической крови модулируется *in vivo* различными цитокинами и хемокинами [9], а также провоспалительными белками и БОФ. При вирусной инфекции и остром воспалении нейтрофилы, мигрирующие к месту повреждения тканей, переходят в праймированное состояние, и их способность к РРВ возрастает [10–12]. Кроме того, показано, что снижение интенсивности РРВ нейтрофилов в периферической крови во время беременности обусловлено увеличением концентрации в крови белка острой фазы церулоплазмينا [13]. Основываясь на этих фактах, мы предположили, что некоторые БОФ могут быть вовлечены в праймирующую стадию активации нейтрофилов.

Ранее нами было показано наличие высокой вероятности участия некоторых БОФ в процессе праймирования нейтрофилов [13, 14]. Учитывая наличие стандартного распределения нейтрофилов в цельной крови по их способности вырабатывать O_2^- для здоровых доноров [15, 16], мы сравнили его с полученными данными для образцов с добавлением белков интереса. Мы выбрали несколько белков острой фазы воспаления (С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид А (САА), альфа-1-кислый гликопротеин (α1AGP) и фибриноген) в качестве объектов дальнейшего изучения. Выбор белков основывался на совпадении времени максимального изменения концентрации белков острой фазы воспаления в крови со временем достижения максимального уровня

праймирования нейтрофилов при развитии ОРВИ [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доноры. Исследование проводили с использованием цельной крови здоровых доноров. Всего в исследовании приняли участие 14 человек, проживающих в Северо-Западном регионе России. Забор крови осуществляли из локтевой вены в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (Эстония), рассчитанные на 3–4 мл крови.

Цитометрическая методика регистрации реакции респираторного взрыва в нейтрофилах с использованием гидроэтидина. Реакцию респираторного взрыва измеряли согласно оригинальной проточноцитометрической методике [15] в образцах цельной периферической крови. В качестве контроля использовали образцы без добавления форболового эфира. В экспериментах по изучению влияния на нейтрофилы периферической крови белков острой фазы воспаления – С-реактивного белка, сывороточного амилоида А, альфа-1-кислого гликопротеина (все – производства Cloud-Clone Corp, США), фибриногена и церулоплазмينا БОФ добавляли к образцам крови в концентрации 35 мкг/мл для СРБ, САА, α1AGP и фибриногена и 0.4 мг/мл для церулоплазмينا. После добавления БОФ образцы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре перед добавлением форболового эфира (10 нг/мл). Интенсивность флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов крови измеряли после инкубации (1.5 ч, 37°C) на проточном цитометре Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, США). Количественным показателем интенсивности реакции респираторного взрыва являлась усредненная интенсивность флуоресценции, испускаемой стимулированными нейтрофилами.

Получение флуоресцентно меченых белков (церулоплазмينا и фибриногена). Препараты церулоплазмينا и фибриногена были получены из стабилизированной цитратом натрия плазмы крови доноров. Церулоплазмин выделяли с помощью хроматографии на колонках с UNOsphere Q и с неомидин-агарозой, для удаления следов тромбина препарат фильтровали через колонку с бензамидин-агарозой [17]. Фибриноген выделяли с помощью фракционирования глицином и сульфатом аммония, с последующей очисткой с помощью хроматографии на UNOsphere Q. Препараты церулоплазмينا и фибриногена флуорохромировали с помощью AF 488 и Cyanine 5 соответственно, используя N-гидроксисукцинимидные эфиры красителей (#1820 и #3020, «Lumiprobe», Россия). Придерживаясь соотношения 4 моля красителя на 1 моль белка, добавляли 20 мкл 1 мМ растворов эфиров красителей в диметилсульфоксиде на 1 мл 5 мкМ растворов бел-

ков в 200 мМ NaHCO₃, реакцию проводили в темноте в течение 2 ч при 4°C. Затем растворы белков помещали в центрифужные ячейки для концентрирования белков (VivaSpin 6, предел удерживания 30 кДа, Sartorius, Германия), проводя не менее 5 циклов 10-кратного концентрирования и разбавления фосфатно-солевым буфером, из раствора удаляли следы красителя и заменяли буфер. Полученные препараты анализировали на отсутствие агрегатов с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле без детергентов [18], у церулоплазмينا оценивали сохранность парафенилендиамина-оксидазной активности [13]. Включение меток и концентрацию меченых белков оценивали по поглощению при 495 нм для AF 488 ($\epsilon_{495} = 71800 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$) и при 646 нм для Cy5 ($\epsilon_{646} = 250000 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$), с использованием факторов коррекции при 280 нм — 0.10 для AF 488 и 0.04 для Cy5.

Локализация взаимодействия белков с нейтрофилами. Периферическую кровь, отобранную в вакуумные гепариновые пробирки Lind-Vac (InterVacTechnology, Эстония) центрифугировали при 252 g в течение 15 мин. Далее слой плазмы переносили в пробирки Эппендорф и центрифугировали в тех же условиях (252 g, 15 мин) для осаждения тромбоцитов. Белую пленку лейкоцитов с небольшим количеством эритроцитов объединяли с центрифугированной плазмой в новых пробирках и окрашивали Hoechst 33342 (до конечной концентрации 10 мкг/мл), чтобы иметь возможность визуально отделить нейтрофилы от прочих клеток крови по флуоресценции и морфологии их ядра. Также добавляли флуоресцентно меченые белки (использовали церулоплазмин, меченый Alexa488, и фибриноген, меченный Cy5). Образцы инкубировали в течение 30 мин. Далее суспензию клеток помещали на предварительно обработанную в течение трех-четырех часов 0.001%-м раствором поли-L-лизина (Sigma-Aldrich, Merck, США) поверхность оптической чашки Петри для конфокальной микроскопии (обработанная поверхность, боросиликатное стекло, стерильная). После инкубации в течение 30–40 мин, необходимой для закрепления нейтрофилов на подложке, образец исследовали с использованием конфокального микроскопа (TCS SP5 SMD FLCS, Leica, Германия). Если эритроцитов слишком много, то перед исследованием на конфокальном микроскопе их избыток осторожно убрали и заполняли образец плазмой.

Статистический анализ. Эксперименты были повторены три раза ($n = 3$), средние значения были рассчитаны как $\bar{X}_m = (1/n)\sum X_i$, где X_i является значением каждой последующей выборки. Стандартная ошибка была выражена как S^*/n , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X}_m)^2}{(n-1)}},$$

доверительный интервал был рассчитан как $\bar{X}_m \pm (S^*/n^{1/2})t_{n-1, 1-\alpha/2}$, где t было найдено в таблице значений при условии, что в наших экспериментах $\alpha = 0.05$. Различия между средними значениями более чем двух групп были проанализированы с помощью метода ANOVA с последующим тестом Даннета.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитометрическая оценка функциональной активности нейтрофилов периферической крови. Для здоровых доноров нейтрофилы периферической крови характеризуются однотипной интенсивностью РРВ (при измерении в цельной крови), рассматриваемой нами как норма.

Добавление САА к образцам цельной крови здоровых доноров не повлияло на результаты измерения, как и добавление a1AGP (рис. 1a).

Добавление СРБ привело к снижению интенсивности РРВ, в то время как добавление СРБ совместно с САА не привело к каким-либо значимым отклонениям от нормы (рис. 1б).

В нашей предыдущей работе было показано, что фибриноген вносит вклад в увеличение интенсивности РРВ нейтрофилов. Чтобы получить больше информации о влиянии фибриногена на активность нейтрофилов, мы также провели эксперимент по оценке интенсивности РРВ нейтрофилов после добавления фибриногена совместно с САА. На рис. 1в показано, что существенных отличий от эффекта, достигаемого добавлением только фибриногена, нет. Стоит отметить, что добавление a1AGP совместно с фибриногеном не повлияло на наблюдаемый эффект. На рис. 1г видно, что интенсивность РРВ нейтрофилов значимо не отличается для образцов с добавлением только церулоплазмينا и с совместным добавлением церулоплазмينا и фибриногена.

Локализация взаимодействия белков острой фазы воспаления с нейтрофилами периферической крови. Для более подробного изучения взаимодействия с нейтрофилами периферической крови белков острой фазы воспаления, значимо влияющих на их функциональную активность (фибриноген и церулоплазмин), мы визуализировали локализацию этого взаимодействия, используя конфокальную микроскопию (рис. 2). На рис. 3 видно, что взаимодействие церулоплазмينا с нейтрофилом локализовано на мембране клетки.

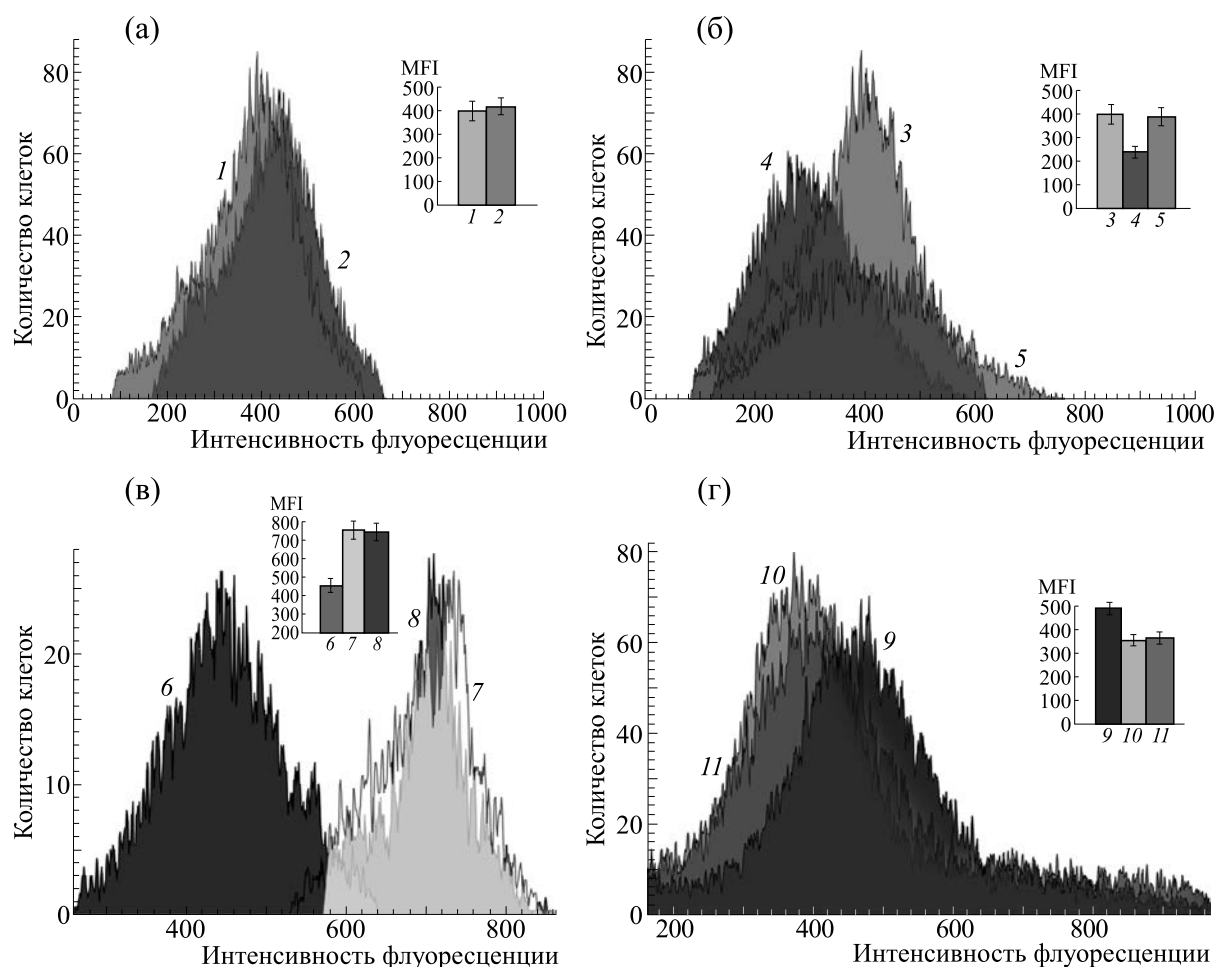


Рис. 1. Интенсивность реакции респираторного взрыва нейтрофилов с добавлением различных белков острой фазы воспаления. (а) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 1 – контрольные измерения, 2 – образцы с добавлением САА (35 мкг/мл), 3 – образцы с добавлением а1АГР (35 мкг/мл). (б) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 4 – контрольные измерения, 5 – образцы с добавлением СРБ (35 мкг/мл), 6 – образцы с добавлением СРБ и САА (по 35 мкг/мл). (в) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 7 – контрольные измерения, 8 – образцы с добавлением фибриногена (35 мкг/мл), 9 – образцы с добавлением фибриногена и САА (по 35 мкг/мл). (г) – Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции: 10 – контрольные измерения, 11 – образцы с добавлением церулоплазмينا (0.4 мг/мл), 12 – образцы с добавлением церулоплазмينا и фибриногена (0.4 мг/мл и 35 мкг/мл соответственно). На врезках: MFI – усредненная интенсивность флуоресценции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многие работы указывают на участие различных белков в регуляции функций нейтрофилов [19, 20–23], в том числе фибриногена, а1АГР, САА и СРБ, однако все они концентрируются на нейтрофилах, уже вышедших в эпителиальные ткани либо начинающих процесс экстравазации. Все эксперименты по оценке функциональной активности в указанных работах проводились на нейтрофилах, выделенных из крови, либо на клетках линии HL-60. Наше же исследование фокусируется на нейтрофилах периферической крови и на модификациях их функциональной активности (происходящих до начала экстравазации). Кроме того, показанный в приведенных работах характер влияния данных белков на

функциональную активность нейтрофилов не согласуется с нашими данными. Это подтверждает крайнюю чувствительность нейтрофилов к внешним условиям [24]: функциональная активность нейтрофилов значительно зависит от микроокружения, следовательно, и способы ее модификации также могут различаться в зависимости от местоположения нейтрофилов, их клеточного окружения (в эпителии или периферической крови). Кроме того, состав плазмы крови подразумевает больший диапазон соединений, способных воздействовать на нейтрофилы, изменяя их функциональную активность (по сравнению с эпителиальной тканью).

Влияние соединений микроокружения нейтрофилов на их функциональную активность, а

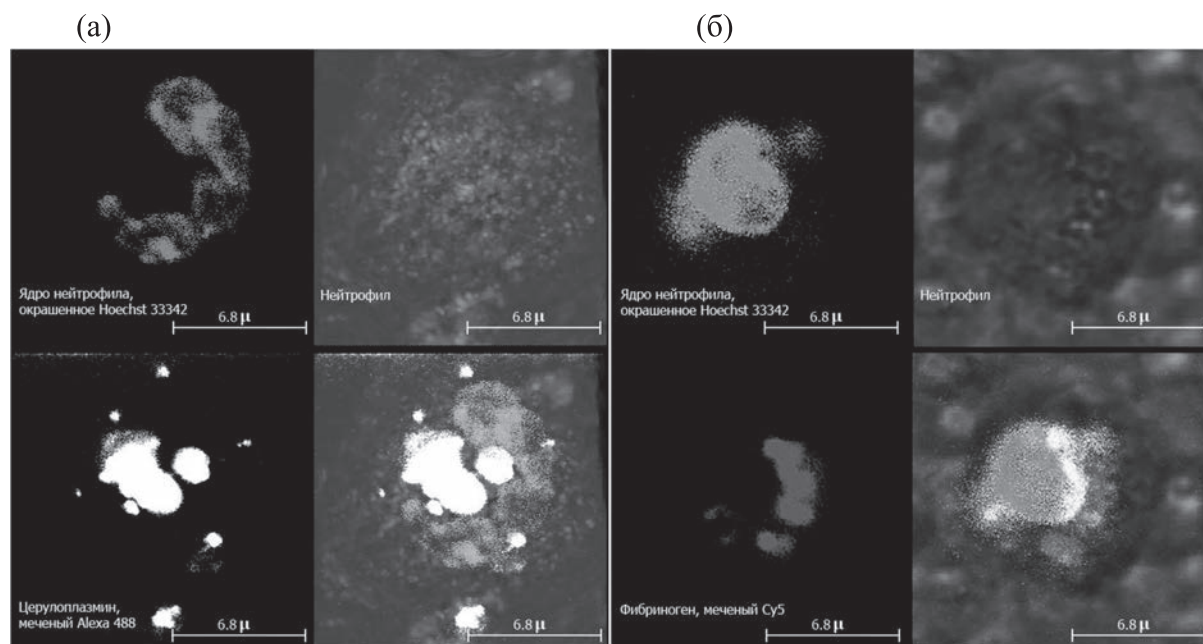


Рис. 2. Визуализация взаимодействия нейтрофила с церулоплазмином (а) и фибриногеном (б).

также значимость этого влияния для патологических процессов — предмет повышенного интереса исследователей в последние несколько лет [25–29]. Не в последнюю очередь это связано с изучением роли нейтрофилов в развитии COVID-19 [26], однако появляется много инте-

ресных работ, рассматривающих неоднозначное участие нейтрофилов и в опухолевых процессах [27–29]. В этих работах в основном рассматривается модулирующее влияние различных цитокинов и хемокинов на реализацию нейтрофилами функций.

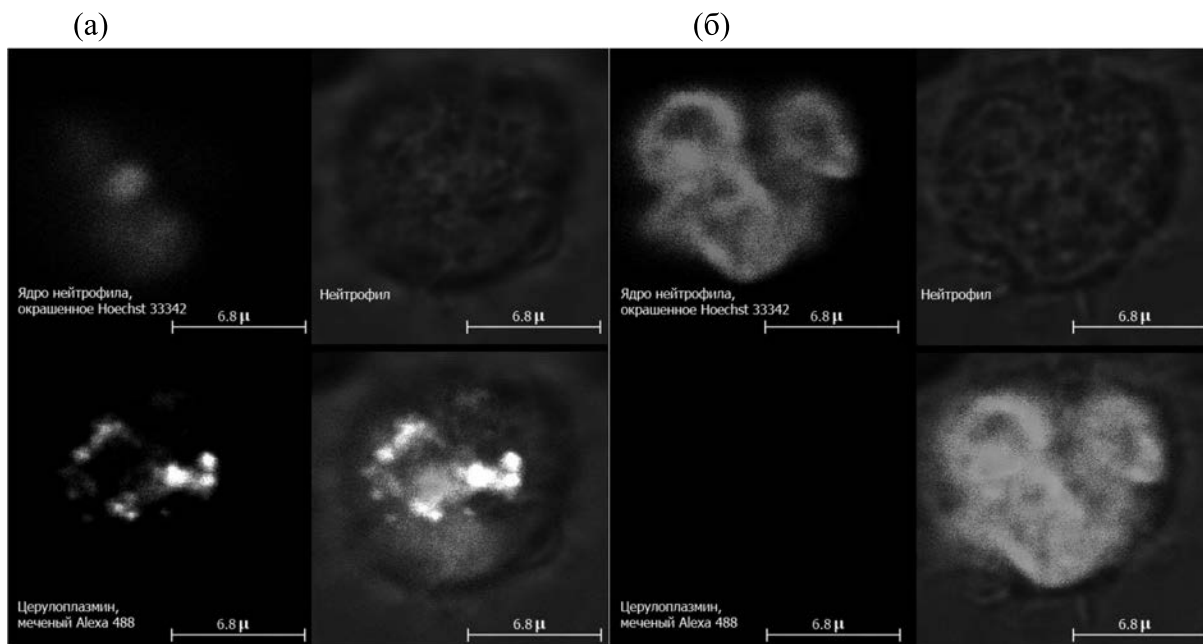


Рис. 3. Визуализация взаимодействия нейтрофила с церулоплазмином на мембране нейтрофила: (а) — конфокальный срез на поверхности нейтрофила, (б) — конфокальный срез ниже поверхности нейтрофила.

Результаты нашего исследования подтверждают предположение о том, что некоторые БОФ, наряду с цитокинами, оказывают влияние на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. Взаимодействие БОФ с нейтрофилами может происходить на стадии праймирования последних. В другой нашей работе [14] мы продемонстрировали влияние вирусной инфекции и повышенных концентраций фибриногена на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. Влияние СРБ, показанное в этой работе, совпадает с изменениями, наблюдаемыми на второй день развития острой респираторной вирусной инфекции. Более того, получены новые интересные данные о совместном влиянии белков острой фазы воспаления на функциональную активность нейтрофилов в периферической крови. Мы показали отличие совместного влияния двух белков (СРБ и САА) на интенсивность РРВ нейтрофилов периферической крови от влияния, оказываемого ими по отдельности. Все эти факты в совокупности могут быть подтверждением вклада БОФ в реализацию нейтрофилами своей функции, а именно, способность к выработке активных форм кислорода. Также, полученные нами данные подтверждают высокую значимость микроокружения для реализации нейтрофилами своей функции, так как они отличаются от результатов, полученных ранее на выделенных нейтрофилах. Локализация взаимодействия БОФ с нейтрофилом на его мембране, для фибриногена показанная и в более ранних работах [30, 31], указывает на мембранный характер механизма влияния БОФ на функциональную активность нейтрофилов и очерчивает дальнейшее направление исследования данного явления.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Использование биологического материала человека (крови) было одобрено заключением локального этического комитета НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ №09-2021/2-ЛЭК от 20.09.2021 г. Все измерения проводили в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 г. От всех участвующих доноров было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Все клинические данные были обезличены.

стии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 г. От всех участвующих доноров было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Все клинические данные были обезличены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. H. Kaufmann, *Nat. Immunol.*, **9**, 705 (2008).
2. N. Borregaard, et al., *Trends Immunol.*, **28**, 340 (2007).
3. P. Nordenfelt and H. Tapper, *J. Leukoc. Biol.*, **90**, 271 (2011).
4. T. L. Leto and M. Geiszt, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1549 (2006).
5. O. Soehnlein, *J. Mol. Med.*, **87**, 1157 (2009).
6. M. Klemke, G. H. Wabnitz, F. Funke, et al., *Immunity*, **29**, 404 (2008).
7. B. D. Hock, K. G. Taylor, N. B. Cross, *Immunology*, **137**, 249 (2012).
8. El-Benna, et al., *Immunol. Rev.*, **273**, 180 (2016).
9. Berton, et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **26**, 160 (1996).
10. M. R. White, E. Crouch, J. Vesona, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **289**, L606 (2005).
11. G. Thomas and B. Rogues, *FEBS Lett.*, **26**, 169 (1972).
12. K. L. Hartshorn, K. Sastry, D. Brown, et al. *J. Immunol.*, **151**, 1 (1993).
13. E. Y. Varfolomeeva, E. V. Semenova, A. V. Sokolov, et al., *Free Radic. Res.*, **50**, 909 (2016).
14. Н. Д. Федорова, Д. А. Сумбатьян, М. А. Стукова и др., *Актуальные вопросы биологич. физики и химии*, **6** (1), 115 (2021).
15. M. Filatov, E. Varfolomeeva, and E. Ivanov, *Biochem. Mol. Med.*, **55**, 116 (1995).
16. E. Yu. Varfolomeeva, E. I. Ivanov, E. A. Drobchenko, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.*, **149**, 485 (2010).
17. A. V. Sokolov, L. Acquasaliente, V. A. Kostevich, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **86**, 279 (2015).
18. B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404 (1964).
19. G. Berton, et al., *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **26**, 160 (1996).
20. K. Prasad, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **9** (3), 203 (2004). DOI: 10.1177/107424840400900308
21. L. Björkman, J. Karlsson, A. Karlsson, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **83** (2), 245 (2008). DOI: 10.1189/jlb.0607-408. Epub 2007 Nov 5. PMID: 17984291
22. M. J. Costello, H. Gewurz, J. N. Siegel, *Clin. Exp. Immunol.*, **55** (2), 465 (1984).
23. E. Hatanaka, F. P. Ribeiro, and A. Campa, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **38** (1), 81 (2003). DOI: 10.1016/S0928-8244(03)00112-3
24. M. Blanter, et al., *Front. Immunol.*, **13**, Art. ID 820058 (2022). DOI: 10.3389/fimmu.2022.820058
25. Li, et al., *Cell Commun. Signal.*, **17**, 147 (2019).
26. D. Wendisch, O. Dietrich, T. Mari, et al., *Cell*, **184** (26), 6243.e27(2021).
27. S. Jaillon, A. Ponzetta, D. Di Mitri, et al., *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 485 (2020).

28. E. J. H. van Houtum, C. Büll, L. A. M. Cornelissen, et al., *Front. Immunol.*, **12**, 790317 (2021).
29. D. F. Quail, B. Amulic, M. Aziz, et al., *J. Exp. Med.*, **219** (6), e20220011 (2022).
30. S. Kamath and G. Y. Lip, *QJM: Int. J. Med.*, **96** (10), 711 (2003). DOI: 10.1093/qjmed/hcg129
31. H. S. Goodridge, A. J. Wolf, and D. M. Underhill, *Immunol. Rev.*, **230** (1), 38 (2009). DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x

The Effect of Acute Phase Proteins on the Activity of Peripheral Blood Neutrophils

N.D. Fedorova*, D.A. Sumbatian*, A.V. Sokolov, M.V. Filatov*,
A.P. Trashkov*, and E.Yu. Varfolomeeva***

**Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»,
mkr. Orlova Roshcha 1, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia*

***Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

Neutrophils are the leading cells of the innate immune system and the main population of leukocytes responsible for the primary reaction of the organism to various infectious agents. The latter are destroyed by neutrophils during the processes of phagocytosis and a cascade of reactions, including the respiratory burst. As a result of the respiratory burst, neutrophils produce reactive oxygen and halogen species, which are powerful cytotoxic agents which destroy foreign particles in the phagolysosome. All of these processes require strict regulation, since excessive activation of neutrophils may lead to higher production of reactive oxygen species thereby causing tissue damage in the focus of inflammation. Acute phase proteins may play a role as regulators of inflammatory processes. Our previous works have shown that ceruloplasmin is involved in the inhibition of the respiratory burst of neutrophils in whole blood samples. Fibrinogen, on the contrary, increased the intensity of respiratory burst. A detailed characterization of the effects acute phase proteins exert on peripheral blood neutrophils' functions has been studied not for all acute phase proteins and especially their combinations. In this paper, for the first time, the flow cytometer and registration of reactive oxygen species production in peripheral blood cells have been used to study the effects of several acute phase reactants (C-reactive protein, serum amyloid A, alpha-1-acid glycoprotein and fibrinogen) on the ability of peripheral blood neutrophils to activate respiratory burst. The results showed that significant changes in the capacity of reactive oxygen species production by neutrophils were seen for a set of combinations of the studied acute phase proteins. The study of the interaction of ceruloplasmin and fibrinogen with peripheral blood neutrophils revealed that they were localized to the membrane. It seems promising to identify receptors for acute phase proteins at the neutrophil membrane.

Keywords: neutrophils, acute phase proteins, respiratory burst, cytometry, confocal microscopy