

Анализ функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов при действии лантан-содержащих препаратов

Н.Т. Козина*, Е.И. Коваленко**

**Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»*

***Белорусский государственный университет*

Действие ионов лантана на нейтрофилы снижает их способность генерировать активные метаболиты кислорода при адгезии и фагоцитозе. При высоких концентрациях ионов лантана эффекты не зависят от присутствия ионов кальция в среде. Частицы серебра приводят к значительному повышению эффективности действия ионов лантана на активность нейтрофилов. Полиэтиленгликоль препятствует агрегационному действию ионов лантана.

Ключевые слова: нейтрофилы, адгезия, фагоцитоз, полиэтиленгликоль.

Analysis of functional activity of neutrophils by under the influence of lanthanum-containing substances

N.T. Kozina*, Ye.I. Kovalenko**

**Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masharov»*

*** Belarusian State University*

Summary. *Effect of lanthanum ions on neutrophils reduces their ability to generate active oxygen metabolites during adhesion and phagocytosis. At high concentrations of lanthanum ions the effects do not depend on the presence of calcium ions in the medium. Particles of silver cause a significant increase of the effectiveness of the influence of lanthanum ions on the activity of neutrophils. Polyethylene glycol prevents aggregation action of lanthanum ions.*

Мощными источниками оксидантов в организме являются фагоцитирующие клетки крови, в первую очередь, сегментоядерные нейтрофилы. Основная функция нейтрофилов – уничтожение патогенных бактерий и грибов [1, 2]. Активированные нейтрофилы генерируют продукты с высокой реакционной способностью ферментативным образом с помощью НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО) [3, 4]. Данные редокс-ферменты активируются при стимуляции нейтрофилов бактериальными пептидами, белками острой фазы, некоторыми провоспалительными цитокинами, адгезионными молекулами, индукторами фагоцитоза. НАДФН-оксидаза и МПО последовательно формируют активированные метаболиты кислорода и галогенов (АКМ) ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$, $NOBr$), способные окислять многие биологически важные молекулы [1–5]. Показано, что при вовлечении нейтрофилов в патофизиологические реакции в организме НАДФН-оксидаза, МПО и другие редокс-ферменты нейтрофилов принимают различное участие [2, 5]. НАДФН-оксидаза представляет собой

мембраносвязанный комплекс, генерирующий $O_2^{\cdot-}$ у наружной поверхности клеток или внутри фаголизосом [4]. МПО, депонированная в покоящихся клетках внутри азурофильных гранул, при активации нейтрофилов может высвобождаться внутрь фаголизосом и катализировать там окислительно-восстановительные реакции, а может секретироваться во внеклеточное пространство и вовлекаться в различные процессы даже без дальнейшего участия нейтрофилов [3, 6]. МПО проявляет высокую окислительную активность, что необходимо для внутриклеточного и внеклеточного уничтожения патогенных микроорганизмов при острой воспалительной реакции. В то же время доказано, что секретированная во внеклеточное пространство МПО является причиной модификации биополимеров и липидов в плазме, эндотелии и других тканях организма и может промотировать развитие хронического воспаления, связанного с атеросклерозом, бронхиальной астмой, аллергическими дерматитами, циститным фиброзом [1, 7–8]. Повышение содержания МПО в плазме является прогностически

неблагоприятным признаком при некоторых заболеваниях, например, уровень МПО в плазме коррелирует с риском инфаркта миокарда. Следует отметить, что хотя в настоящее время существует ряд высокоэффективных лекарственных препаратов с антиоксидантным действием, тем не менее по-прежнему остается актуальным поиск веществ с избирательным действием на отдельные редокс-ферменты и оксиданты.

Механизмы активации нейтрофилов при воспалительном повреждении тканей тесно связаны с функционированием Ca^{2+} -зависимых каналов плазматической мембраны клетки. Очевидно, для борьбы с воспалительным процессом в организме одним из направлений лечения может стать блокирование транспорта ионов кальция в клетку. При этом важно учесть скорость поступления активного действующего вещества к очагу воспаления, а также пролонгирование его действия во времени. Наличие терапевтических эффектов в сочетании с невысокой токсичностью выявлено для ионов лантана. При введении в организм La^{3+} может оказывать иммуномодулирующее действие, поскольку приводит к ингибированию хемотоксической и фагоцитарной активности нейтрофилов и генерации ими активных кислородных метаболитов, индуцированной IgG, модулирует процессы агрегации и дезагрегации клеток крови, вызывает реорганизацию актинового цитоскелета и апоптоз опухолевых клеток.

Оптимальной лекарственной формой препаратов на основе солей лантана являются мягкие лекарственные формы в виде мазей, кремов или гелей. Это позволяет наносить препарат на кожные покровы непосредственно в месте локализации очага воспаления, что сокращает временной промежуток между началом лечения (введение активного действующего вещества) и моментом наступления терапевтического эффекта. В настоящее время широко используются комплексные и высокомолекулярные соединения при создании фармацевтических средств, что позволяет в ряде случаев достичь более выраженных и/или пролонгированных лечебных эффектов. Ионы металлов можно сорбировать на различных природных и синтетических полимерах, пептидах, аминокислотах, с которыми они способны формировать координационные связи. Имеются данные, что при низких концентрациях La^{3+} может связываться с каналами для Ca^{2+} на поверхности цитоплазматической мембраны и блокировать

их, то есть La^{3+} может выступать в качестве антагониста Ca^{2+} и супрессировать Ca^{2+} -зависимые процессы активации клеток. Таким образом, целью работы является изучение реакций фагоцитарных клеток крови при воздействии препаратов, содержащих ионы лантана. При этом важным этапом работы является исключение эффектов, оказываемых вспомогательными веществами, используемыми при создании мягких лекарственных форм, например таких, как полиэтиленгликоль (сплав 400–4500), повияргол (высокодисперсное серебро, стабилизированное низкомолекулярным медицинским поливинилпирролидоном).

Материал и методы. В работе изучены водорастворимые лекарственные препараты, содержащие нитрат лантана: 1) гель лантана (ООО «Рубикон», Беларусь), представляющий собой комплексное соединение полиэтиленгликоля $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 400/4500 и $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (4%); 2) суспензия «Лантамед» (ООО «Рубикон», Беларусь), включающая в состав 4% $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и 1% повияргола (металл-полимерная композиция, содержащая 7% высокодисперсного Ag, стабилизированного поливинилпирролидоном); 3) $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 4) гель повияргола 1% (ООО «Рубикон», Беларусь), представляющий собой комплексное соединение геля карбопола и повияргола. Перед проведением экспериментов препараты растворяли в 0,15 М NaCl. В работе также использованы: декстран-500, фиколл-400, люминол, Triton X-100 («Sigma», США); урографин («Schering AG», Германия); гепарин, латекс («Белмедпрепараты», Беларусь); соли NaCl, KCl, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaHCO_3 и глюкоза, все х.ч.

Выделение нейтрофилов из донорской крови проводили по методу, описанному в работе [6]. В итоге полученная фракция содержала не менее 96% нейтрофилов. Для определения спектров поглощения и люминесцентных свойств препаратов нитрата лантана измеряли оптическую плотность (D) и пропускание (T%) образцов с помощью спектрофотометра PV 1251A («Солар», Беларусь) в области 325–700 нм. Спектры испускания образцов регистрировали с использованием спектрофлуориметра LSF 1211A («Солар», Беларусь). Для измерений использованы кварцевые прямоугольные кюветы толщиной 1 см. Измерения проводились при комнатной температуре.

Повреждение нейтрофилов при действии препаратов лантана исследовали по высвобождению из клеток цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Агрегацию

нейтрофилов исследовали методами турбидиметрии (нефелометрии) и световой микроскопии. С помощью агрегометра AP 2110 («Солар», Беларусь) регистрировали кинетические зависимости коэффициента пропускания света T (в диапазоне от 500 до 700 нм) до и после внесения препаратов нитрата лантана в суспензии нейтрофилов. Измерения проводили при 37°C, в среде с добавлением CaCl_2 . Содержание нейтрофилов в образцах составляло $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Процесс агрегации контролировали визуально с использованием светового микроскопа «Биолам П-1».

Адгезивность нейтрофилов исследовали, оценивая силу прикрепления клеток к подложке. Клетки инкубировали в стеклянных кюветах в присутствии препаратов нитрата лантана в течение 30 мин при 37°C; затем пластинки дважды промывали в среде Эрла. Количество оставшихся прикрепленных к подложке клеток (на единицу площади) определяли с использованием светового микроскопа.

Генерацию нейтрофилами активных кислородных метаболитов изучали методом люминол-опосредованной хемилюминесценции при активации клеток в ходе адгезии на стекло, действии хемотаксического агента fMLP и фагоцитозе латекса с помощью измерительного аппаратно-программного комплекса БХЛ-1-«Unichrom» (БГУ, «Новые аналитические системы», Беларусь). Измерения проводили при

37°C и $\text{pH} = 7,2-7,4$, в среде с добавлением CaCl_2 . Содержание нейтрофилов в образцах составляло $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Суспензию клеток помещали в стеклянную кювету, добавляли люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и регистрировали кинетические зависимости люминол-опосредованной хемилюминесценции, обусловленной генерацией нейтрофилами АКМ в ходе адгезии клеток на стекло. Через 10 мин в образцы также вносили латекс (30 мкл разбавленного базового раствора для определения ревматоидного фактора) или fMLP ($1 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и определяли параметры люминол-опосредованной хемилюминесценции, обусловленной образованием АКМ в ходе фагоцитоза латекса нейтрофилами. Интегральную интенсивность хемилюминесценции клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 10 мин при стимуляции клеток в ходе адгезии и за 4 минуты при действии латекса или fMLP.

Каждый эксперимент проводился с повторностью 3–5 раз. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel. Различия считали достоверными при уровне значимости различий $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследовано влияние препаратов лантана на хемилюминесценцию при окислении люминола, катализируемом пероксидазой (рис.).

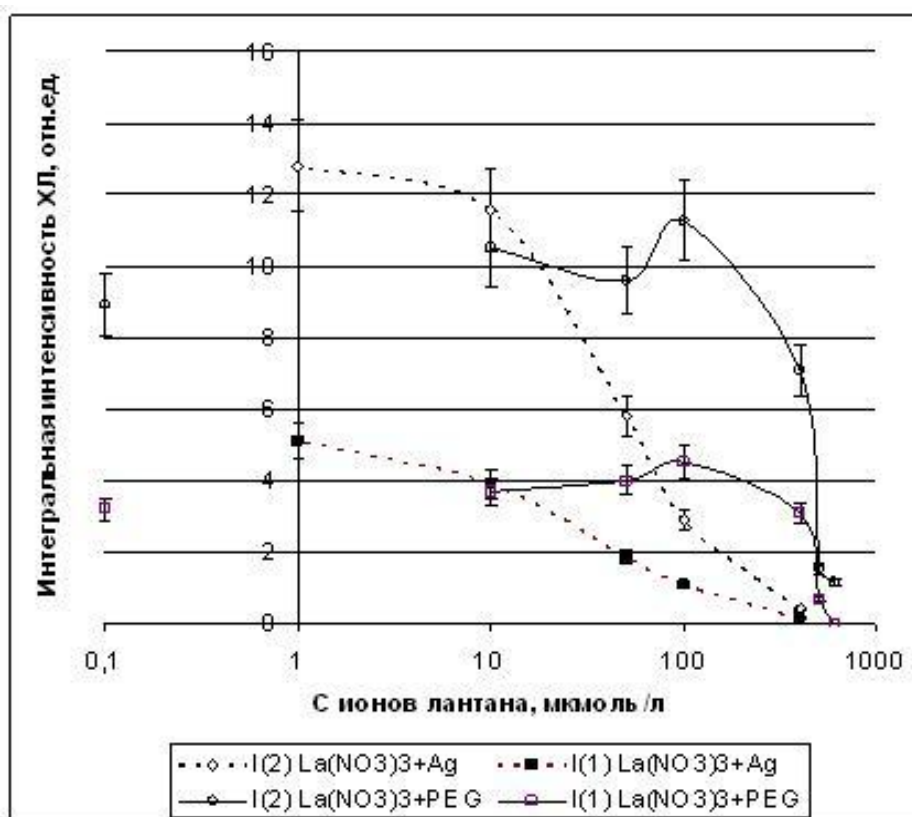


Рис. Влияние нитрата лантана в комплексе с повииарголом (+Ag) и в комплексе с гелем полиэтиленгликоля (+PEG) на интенсивность ХЛ в системе с «ПХ +H₂O₂+люминол».

Из рисунка следует, что лантамед снижает интенсивность свечения в данной системе при концентрациях нитрата лантана, превышающих 10 мкмоль/л, а гель ПЭГ с нитратом лантана (как и «чистого» нитрата лантана) — при концентрациях ионов лантана выше 0,5 мкмоль/л.

Оказалось, что изменение интенсивности ХЛ может быть связано не только с ингибирующим действием ионов La³⁺, но и поглощением излучения «повииарголом», входящем в состав «Лантамеда». «Повииаргол» поглощает с максимумом на длине волны $\lambda_{\text{макс}} = 408$ нм, $\epsilon_{408} = 590 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, полуширина полосы — 65 нм; «Лантамед»

— $\lambda_{\text{макс}} = 404$ нм, $\epsilon_{404} = 540 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, полуширина полосы — 60 нм и при этом они не флуоресцируют. Фотолюминесценция люминола в 0,15 М NaCl наблюдается в области 370–580 нм, $\lambda_{\text{макс}} = 427$ нм, полуширина полосы около 60 нм (400–460 нм). Таким образом, полосы поглощения «Повииаргола» и «Лантамеда» перекрываются с полосой флуоресценции люминола (как и 3-аминофталата), что приводит к снижению интенсивности испускания света люминолом (как и 3-аминофталатом). Следует отметить, что нитрат лантана без ПЭГ и

повииаргола, не влияет на поглощение и испускание света люминолом в концентрациях до 2 ммоль/л (максимальная использованная концентрация), как и ПЭГ-400 без нитрата лантана.

В то же время нитрат лантана в комплексе с ПЭГ приводит к изменению поглощения света и усилению люминесценции люминола. Эффект усиления составил 100% при 2 ммоль/л нитрата лантана в комплексе с ПЭГ, 50% при 0,2 ммоль/л и около 5% при 20 мкмоль/л.

Полученные данные следует учитывать при анализе результатов, полученных при исследовании хемилюминесценции нейтрофилов.

В результате изучения влияния препаратов, содержащих La(NO₃)₃, на процесс генерации активных кислородных метаболитов при адгезии нейтрофилов на стекло и при внесении латекса обнаружено, что все изученные препараты могут приводить к ингибированию генерации активных кислородных метаболитов нейтрофилами, активируемыми в ходе адгезии клеток на стекло. Этот эффект наименее выражен для препарата лантана с ПЭГ и наблюдается при концентрации лантана в среде, превышающей 100 мкмоль/л. Для раствора La(NO₃)₃·6H₂O в 0,15 М NaCl

ингибирование имеет место при концентрации 10 мкмоль/л и выше (при 5–10 ммоль/л 100% ингибирование), а для препарата «Лантамед» – при концентрациях, составляющих десятые доли мкмоль/л. В случае активации нейтрофилов латексом добавление растворов $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и препарата «Лантамед» приводит к ингибированию генерации АКМ при тех же концентрациях, что и в случае адгезии. Однако при воздействии растворенного геля лантана латекс-индуцированная генерация активных кислородных метаболитов не ингибируется, а, наоборот, усиливается при концентрациях, вызывающих снижение образования активных кислородных метаболитов при адгезии. Оказалось, что при внесении геля лантана происходит не только изменение суммарного выхода АКМ, как в случае других препаратов, но и изменение кинетики процесса: в первые минуты после начала адгезии выход АКМ возрастает, а только затем снижается.

Механизмы влияния ионов La^{3+} , входящих в состав изучаемых препаратов, на процессы генерации АКМ нейтрофилами при адгезии к стеклу и при фагоцитозе латекса могут включать блокирующее действие La^{3+} на транспорт Ca^{2+} через каналы цитоплазматической мембраны и Ca^{2+} -зависимую внутриклеточную передачу сигналов, поскольку формирование комплексов, генерирующих активные кислородные метаболиты, и поддержание их продолжительной активации при адгезии и фагоцитозе требуют потока Ca^{2+} через клеточную мембрану. Как известно, поверхность клеток несет отрицательный заряд, что существенно влияет на адгезионные и другие свойства клеток. При высоких концентрациях La^{3+} может снижать поверхностный потенциал клеток, взаимодействуя с отрицательными зарядами поверхности. В таком случае действие La^{3+} будет независимым от Ca^{2+} и трансдукции сигналов в клетках; нейтрофилы не будут взаимодействовать или, наоборот, будут налипать на различные субстраты вследствие изменения зарядового профиля поверхности. Не исключены и другие механизмы действия La^{3+} .

Обнаруженные различия эффектов, вызываемых изученными препаратами, могут быть объяснены совместным действием входящих в их состав веществ. Более сильное действие комплексного препарата «Лантамед», включающего $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и повиаргол, по сравнению с одним $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ очевидно обусловлено сочетанным действием $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и повиаргола, для последнего из которых

продемонстрированы антиокислительные эффекты на модельной системе с гидропероксидом и гипохлоритом. Необходимость более высоких концентраций лантана для проявления ингибирующего эффекта геля лантана, по-видимому, связана с сорбционными свойствами ПЭГ. Во-первых, сами ионы лантана могут быть сорбированы на ПЭГ и находиться в связанном состоянии. В таком случае La^{3+} высвобождается в раствор постепенно и реальная концентрация свободных ионов La^{3+} в среде, доступных для взаимодействия с клетками, ниже рассчитанной на основе количественного состава препарата. Во-вторых, на ПЭГ могут сорбироваться и другие вещества, участвующие в процессах генерации АКМ или/и используемые для регистрации АКМ. И, в-третьих, ПЭГ может сорбироваться на клеточной поверхности и изменять ее физико-химические свойства, влияя на межклеточную коммуникацию и адгезионные свойства нейтрофилов.

Таким образом, действие ионов лантана на нейтрофилы выражается в ингибировании способности нейтрофилов генерировать АКМ при адгезии и фагоцитозе, образовании неактивных клеточных агрегатов и предотвращении адгезии нейтрофилов на поверхность субстрата. При высоких концентрациях La^{3+} эффекты не зависят от присутствия Ca^{2+} в среде. Частицы серебра (препарат повиаргол) приводят к значительному повышению эффективности действия La^{3+} на активность нейтрофилов. В препарате геля лантана с ПЭГ полиэтиленгликоль препятствует агрегационному действию La^{3+} и ингибиторному влиянию La^{3+} на генерацию АКМ при фагоцитозе латекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nathan, C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities / C. Nathan // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 173–182.
2. Aratani, Y. Role of Myeloperoxidase in the Host Defense against Fungal Infection / Y. Aratani // *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* – 2006. – Vol. 47, № 3. – P. 195–199.
3. Arnhold, J. Review: properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)* / J. Arnhold // – 2004. – Vol. 69, № 1. – P. 4–9.
4. Babior, B.M. NADPH oxidase: an update / B.M. Babior // *Blood.* – 1999. – Vol. 93, № 5. – P. 1464–1476.
5. Kavalenka, A.I. Systems of reactive oxygen species generation in human neutrophils: chemiluminescent analysis / A.I. Kavalenka [et al.] // *Clin. Lab.* – 2003. – Vol. 49, № 9/10. – P. 566.
6. Kavalenka, A.I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A.I. Kavalenka, G.N. Semenkova, S.N. Cherenkevich // *Cell Tissue Biol.* – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 551–559.
7. Welte, T. Asthma and COPD / T. Welte, D.A. Groneberg // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2006. – Vol. 57, Suppl. 2. – P. 35–40.

8. Exner, M. Myeloperoxidase Predicts Progression of Carotid Stenosis in States of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol / M. Exner [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2006. – Vol. 47. – P. 2212–2218.

Поступила в редакцию 24.05.2010

Адрес для корреспонденции: 210038, г. Витебск, Московский пр-т, д. 33, УО «ВГУ им. П.М. Машерова», кафедра химии,
e-mail: chirkin@tut.by – Козина Н.Т.