

ВЛИЯНИЕ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ НА АГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ

Sodium hypochlorite effects on neutrophil aggregative properties have been investigated. It has been established that sodium hypochlorite in micromole concentration range caused formation of cellular aggregates without aggregation inducers and also promoted the increase of PNA-induced cell agglutination degree. The increase of sodium hypochlorite concentration to values at which destruction of cells was observed led to suppression of PNA-induced neutrophil aggregation.

Активированные нейтрофилы генерируют супероксидные анион-радикалы с участием белкового комплекса – НАДФН-оксидазы [1]. Последующая спонтанная или каталитическая дисмутация этих частиц приводит к образованию пероксида водорода, который в присутствии миелопероксидазы реагирует с хлорид-ионами, образуя гипохлорит [2]. Известно, что на начальных стадиях стимуляции клеток к фагоцитозу наблюдается усиление секреции миелопероксидазы из фагоцитов во внеклеточную среду [3–6]. Небольшое количество миелопероксидазы постоянно присутствует в плазме крови здоровых людей. При ряде воспалительных процессов, в том числе и при сердечно-сосудистой патологии, секреция миелопероксидазы во внеклеточное пространство из азурофильных гранул фагоцитов увеличивается. Кроме того, при некоторых патологических состояниях отмечено локальное закисление среды за счет снижения рН в тканях сосудистой стенки, например в атеросклеротических бляшках, что способствует активации галогенирующего цикла миелопероксидазы и повышению выхода гипохлорита во внеклеточную среду [7, 8]. В высоких концентрациях гипохлорит может индуцировать повреждение жизненно важных молекул и тканей, что может приводить к нарушению процессов метаболизма [9]. Ранее нами установлено, что в низких концентрациях гипохлорит натрия способен активировать нейтрофилы, индуцируя увеличение продукции активных форм кислорода [10]. Взаимодействуя с аминами, гипохлорит образует хлорамины, которые могут вызывать деструкцию компонентов плазмы, клеток крови и сосудов [5]. Однако для хлорамина, полученного при взаимодействии гипохлорита с таурином, показано снижение продукции воспалительных медиаторов, таких как супероксидные анион-радикалы, пероксид водорода, оксид азота(II), а также увеличение синтеза компонентов системы антиоксидантной защиты посредством активации антиоксидант-респонсивного элемента Nrf2 и усиления экспрессии пероксиредоксина-I, тиоредоксина-I и гемоксигеназы макрофагов [6].

Одним из свойств нейтрофилов является их способность к агрегации. Участие этих клеток в межклеточных взаимодействиях играет важную роль при формировании тромбов, а гипохлорит и хлорамины могут вмешиваться в этот процесс [8, 10]. Цель настоящего исследования – изучить влияние гипохлорита натрия в микромолярных концентрациях на спонтанную и индуцированную фитогеммагглютинином (ФГА) агрегацию нейтрофилов крови человека.

Материал и методика

В работе использованы реагенты: декстран-500, фиколл-400, ФГА, NaOCl («Sigma», США); урографин («Schering AG», Германия); NaCl, KCl, NaH₂PO₄·H₂O, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂, NaHCO₃, глюкоза, наборы для определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) («Анализ-Х», Беларусь). Сбалансированный буферный солевой раствор (СБСР) Эрла собственного приготовления включал (ммоль/л): NaCl – 116,2, KCl – 5,4, NaH₂PO₄·H₂O – 0,9, MgSO₄·7H₂O – 0,8, CaCl₂ – 1,8, NaHCO₃ – 26,2, глюкозы – 5,6.

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых людей по методике [12]. Гепаринизированную кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7 % раствором декстрана-500 в 0,15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С для седиментации эритроцитов. В пробирки наливали по 3 мл фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$), на который осторожно наслаивали по 9 мл плазмы, обогащенной лейкоцитами, и центрифугировали в течение 30 мин при 400 g для разделения лейкоцитов по плотности. Надосадочную жидкость сливали, примесь эритроцитов удаляли с помощью гемолитического шока. Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl, центрифугуя в течение 10 мин при 400 g. Полученную фракцию суспензировали в СБСР Эрла при рН 7,2. Содержание нейтрофилов составляло не менее 96 %.

Агрегацию клеток исследовали методом светопропускания с использованием анализатора агрегации тромбоцитов AP 2110 («Solar», Беларусь) [13]. Измерения проводили при $T = 37 \text{ °С}$ в СБСР Эрла (рН = 7,2) с добавлением $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л CaCl₂. Индуктор агрегации – ФГА в конечной концентрации 20 мкг/мл.

Влияние гипохлорита натрия на жизнеспособность нейтрофилов определяли спектрофотометрическим методом по выходу ЛДГ из клеток во внеклеточное пространство [14].

Полученные результаты x в работе представлены в виде

$$x = \langle x \rangle \pm t_{\alpha} \cdot \alpha \quad (\text{для } p = 0,95),$$

где α – среднее квадратичное отклонение, t_{α} – коэффициент Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Из зависимости светопропускания суспензии нейтрофилов от времени после добавления гипохлорита натрия в различной концентрации (рис. 1) (концентрация нейтрофилов – $4 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) видно, что введение 0,75 мкмоль/л NaOCl (кривая 1) незначительно влияет на светопропускание клеточной суспензии. Увеличение концентрации гипохлорита до 15 мкмоль/л (кривая 2) уменьшает светопропускание суспензии нейтрофилов на 12 %, что свидетельствует о стимуляции процесса образования клеточных агрегатов. Повышение концентрации NaOCl до 150 мкмоль/л (кривая 3) приводит к более быстрому увеличению светопропускания, причем спустя 4 мин после добавления гипохлорита амплитуда колебаний на кривой светопропускания резко возрастает, что связано с ростом числа клеток в агрегате. Затем (в течение 0,5 мин) светопропускание анализируемой суспензии резко увеличивается и достигает уровня постоянных значений. Наблюдения с использованием светового микроскопа показали, что в первые минуты действия гипохлорита в клеточной суспензии образуются агрегаты нейтрофилов, состоящие из 4–7 клеток. Последующее увеличение светопропускания при концентрации NaOCl 150 мкмоль/л сопровождается укрупнением клеточных агрегатов.

Известно, что гипохлорит натрия и продукты его взаимодействия с аминокислотами и аминами, такие как хлораминовые производные таурина и некоторых протеиногенных аминокислот, в концентрациях от $0,2 \cdot 10^{-3}$ до $0,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л оказывают антиагрегационное действие на тромбоциты и нейтрофилы, стимулированные арахидоновой кислотой и другими агрегирующими факторами [10, 11]. Нами изучено влияние гипохлорита натрия в низких концентрациях на ФГА-индуцированную агрегацию нейтрофилов ($4 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл). Как следует из рис. 2, при внесении ФГА в суспензию клеток интенсивность светопропускания увеличивается и через 4 мин достигает постоянных значений (кривая 1). Гипохлорит натрия в концентрации 0,75 и 15 мкмоль/л индуцирует увеличение светопропускания суспензии нейтрофилов до 30 % (кривые 2 и 3). Однако повышение концентрации NaOCl до 100 мкмоль/л приводит к полному ингибированию ФГА-индуцированной агрегации (кривая 4).

Лектинииндуцированная агглютинация клеток сопряжена с рядом рецепторопосредованных сигнальных процессов, включающих фосфорилирование внутриклеточных белков и липидов [15, 16], изменение уровня цитоплазматического кальция [17], метаболизм арахидоновой кислоты [18]. В работе [19] показано, что NaOCl в концентрациях, приближающихся к миллимолярным, оказывает антиагрегационное действие на нейтрофилы и тромбоциты, индуцированные арахидоновой кислотой. При этом гипохлорит натрия приводит к изменению соотношения вкладов липоксигеназного и циклооксигеназного путей ее метаболизма. Ве-

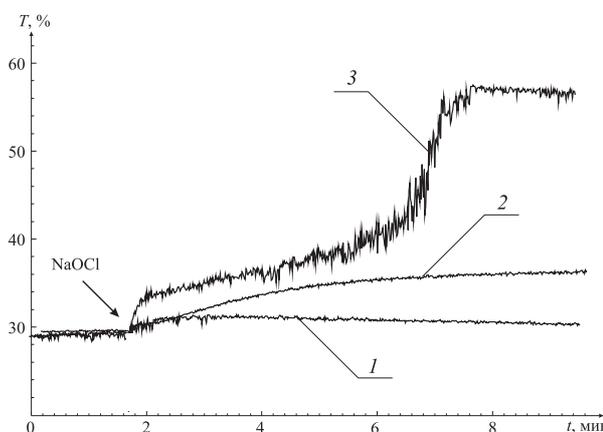


Рис. 1. Кинетические зависимости агрегации нейтрофилов при действии NaOCl (мкмоль/л):
1 – 0,75; 2 – 15; 3 – 150

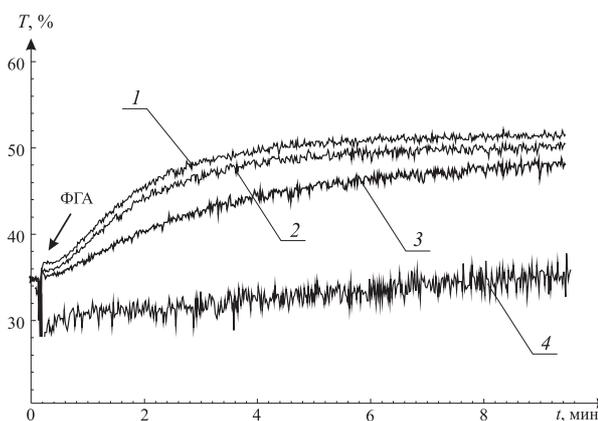


Рис. 2. Кинетические зависимости ФГА-индуцированной агрегации нейтрофилов при различных концентрациях NaOCl (мкмоль/л):
1 – контроль; 2 – 0,75; 3 – 15; 4 – 100

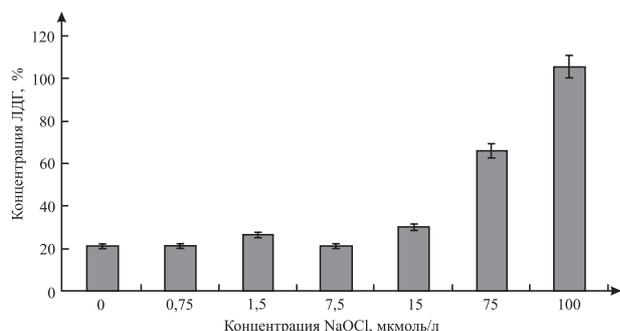


Рис. 3. Влияние гипохлорита натрия на выход ЛДГ из нейтрофилов

ния с гипохлоритом – 1 ч). Из рис. 3 видно, что после инкубирования суспензии клеток с гипохлоритом натрия в диапазоне концентраций от 0,75 до 15 мкмоль/л жизнеспособность нейтрофилов была такой же, как и в контрольных пробах. При повышении концентрации NaOCl до 75 мкмоль/л выход ЛДГ из нейтрофилов по сравнению с контролем возрастал приблизительно на 40 %, а в присутствии 100 мкмоль/л гипохлорита достигал 100 %, что свидетельствует о полном разрушении клеток. Поскольку при исследовании влияния гипохлорита на процессы агрегации нейтрофилов продолжительность экспериментов составляла менее 1 ч, можно предположить, что эффекты, полученные при действии NaOCl в концентрациях до 75 мкмоль/л, не являются результатом цитодеструктивного воздействия этого окислителя.

Таким образом, можно заключить, что гипохлорит натрия в микромолярных концентрациях, не оказывающих повреждающего действия на нейтрофилы, вызывает образование клеточных агрегатов в отсутствие индукторов агрегации, а также способствует увеличению степени ФГА-индуцированной агглютинации клеток. Повышение концентрации гипохлорита до значений (100 мкмоль/л), при которых наблюдается цитодеструкция, приводит к подавлению агрегации клеток, обусловленной действием ФГА.

1. Babior V.M. // Blood. 1999. Vol. 93. № 5. P. 1464.
2. Власова И.И., Арнхольд Ю., Осипов А.Н., Панасенко О.М. // Биохимия. 2006. № 71. С. 825.
3. Kavalenka A.I., Semenkov G.N., Chelenkevich S.N. et al. // Clin. Lab. 2003. Vol. 49. P. 566.
4. Арнхольд Ю. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 1. P. 4.
5. Мурина М.А., Рошупкин Д.И., Кравченко Н.Н. и др. // Биофизика. 1997. Т. 42. С. 1279.
6. Jin Sun Jang, Shuyu Piao, Young-Nam Cha, Chaekyun Kim // J. Clin. Biochem. Nutr. 2009. Vol. 45. P. 37.
7. Hazen S.L., Hsu F.F., Duffin K. // J. Biol. Chem. 1996. № 271. P. 23080.
8. Мурина М.А., Савельева Е.Л., Рошупкин Д.И. // Биофизика. 2006. Т. 51. С. 299.
9. Klebanoff S.J. // J. Leukocyte Biol. 2005. Vol. 77. № 1. P. 529.
10. Жолнеревич И.И., Семенкова Г.Н. Радиофизика, электроника, фотоника и биофизика: Материалы IX Харьков. конф. мол. ученых, Харьков, 1–3 дек. 2009 г. Харьков, 2009. С. 127.
11. Chatham W.W., Turkiewicz A., Blackburn W.D.J. // J. Leukoc. Biol. 1994. Vol. 56. P. 654.
12. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. М., 1980.
13. Timoshenko A.V., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. // FEBS Letters. 1999. Vol. 449. P. 75.
14. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж, 2000.
15. Gabius H.-J., Walzel H., Joshi S.S. // Anticancer Res. 1992. № 12. P. 669.
16. Ohta Y., Kawato S., Tagashira H. // Biochemistry. 1992. № 31. P. 12680.
17. Гуковская А.С. // Успехи совр. биологии. 1984. № 97 (2). С. 179.
18. Nathan C.E. // Ciba Found. Symp. 1986. P. 118.
19. Мурина М.А., Рошупкин Д.И., Петрова А.О., Сергиенко В.И. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. 2009. № 10. С. 43.

Поступила в редакцию 29.03.10.

Иван Иванович Жолнеревич – аспирант кафедры биофизики. Научный руководитель – Г.Н. Семенкова.

Галина Николаевна Семенкова – кандидат биологических наук, доцент кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий.