

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ НА ВВЕДЕНИЕ МЕТАЛЛОДЕКСТРАНОВ *IN VITRO*

Воробей Е. В., Выговская А. И. (Учреждение образования «Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова», кафедра анатомии и физиологии человека)

Аннотация. В работе обсуждаются результаты влияния комплексно связанных с декстраном железа, кобальта и меди на фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов крови *in vitro*. Выявлено, что металлодекстраны вызывают развитие оксидативного повреждения, влияющего на структурно-функциональную реорганизацию ядерного и лизосомального аппаратов клеток. Полученные данные имеют прикладное значение в понимании механизмов возникновения токсических эффектов препаратов железа для парентерального применения.

Из всех популяций клеток крови наиболее реактивными являются нейтрофильные гранулоциты (НГК). Именно они и определяют механизмы неспецифической резистентности не только при контакте с микробными агентами, но и под влиянием хемоаттрактантных сигналов другой природы. В этих условиях их активация начинается практически немедленно, а развитие последующих событий зависит от клеточного микроокружения. Так, фагоцитарная активность НГК начинает проявляться спустя 60 мин после добавления дрожжевой культуры, а ранние воспалительные реакции с участием этих клеток реализуются уже в течение нескольких часов [1].

Такая высокая скорость функциональных реакций требует разработки и соответствующих методических подходов, включая мониторинг динамики процессов, которые отвечали бы требованиям экспресс-анализа. Этой цели, на наш взгляд, соответствует люминесцентный микроспектральный анализ при витальном флуорохромировании клеток красителями, которые избирательно окрашивают клеточные структуры [2].

Следует обратить внимание на то, что зрелые нейтрофилы как высокоспециализированные клетки имеют короткий период пребывания в циркуляции (не более суток), а затем с ними происходят необратимые изменения в результате реализации программируемой клеточной гибели. Таким образом, зрелые нейтрофилы поступают в циркуляцию с уже запущенными начальными механизмами, реализующими апоптотическую программу этой популяции клеток крови [4]. Поэтому, сочетание прижизненного флуорохромирования и исследования специфических функций НГК, прежде всего, фагоцитарной активности, может предоставить достаточно подробную картину внутриклеточных взаимодействий лизосомального и ядерного аппарата и является перспективным направлением комплексного исследования функциональных реакций этих клеток. При описании возможных физиологических механизмов влияния катионов железа, меди и кобальта, входящих в состав металлодекстранов (МД), указывалось, что эти микроэлементы вызывают реакции, лежащие в основе их фармакологического диапазона (активация эритропоэза посредством моделирования взаимодействий HIF/HRE и IRP/IRE и ускорение метаболических путей поступления железа внутрь клетки). Но в то же время катионы Fe^{2+} , Co^{2+} и Cu^{2+} определяют и возможную цитотоксичность при парентеральном применении МД (внутриклеточный оксидативный стресс, поступление декстранатов этих элементов внутрь клетки). Показано, что активация гранулоцитов является причиной развития в них железо-зависимого оксидативного метаболизма при участии ферроксидаз (в частности, лактоферрина и церулоплазмينا) [3].

Таким образом, со стороны НГК при введении МД *in vitro* следует ожидать комплексных реакций, связанных с эндоцитозом МД, поступлением МД внутрь клеток, и последующим включением в состав различных клеточных структур. Эти процессы могут найти отражение при исследовании фагоцитарных реакций, что и определяет актуальность настоящего исследования [5].

Материалы и методы исследования

Объектом настоящего исследования послужили образцы венозной крови, полученной при венепункции кубитальных вен 54 практически здоровых добровольцев-мужчин в возрасте от 18 до 35 лет, не принимавших на момент исследования никаких лекарственных препаратов. Для постановки эксперимента МД добавлялись в образцы цельной крови *in vitro* (70 мкл/мл для рондферрина и 10 мкл/мл для спейсферрона), что не превышает среднетерапевтических доз и позволяет, таким образом, избежать прямых токсических эффектов. С целью исключения влияния модифицированного декстрана самого по себе проведено аналогичное исследование при инкубации образцов крови с неорондексом (как препаратом на основе только модифицированного декстрана, также в количестве 70 мкл/л).

В дальнейшем образцы крови с препаратами инкубировались в пластиковых тубах при 37°C в течение 60 и 180 минут. Исследование функционального состояния НГК проводилось с помощью люминесцентно-

го микроспектрального анализа (двухволновой микрофлуориметр-фотометр ДМФ-2 (Институт биофизики РАН, Пущино) на базе микроскопа «Люмам») при суправитальном флуорохромировании НГК акридин-оранжем 1×10^{-5} М в фосфатном буфере (рН 7,2). Объект фагоцитоза – живые клетки *S. cerevisiae*. Рассчитывались фагоцитарный индекс (ФИ) – число нейтрофилов (%), участвующих в фагоцитозе; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число дрожжевых частиц, поглощенных одним фагоцитом; число активных фагоцитов (АФ) – число фагоцитов (%), содержащих хотя бы одну активно перевариваемую дрожжевую клетку; индекс переваривания (ИП) – процентное отношение числа активно перевариваемых дрожжевых клеток ко всем поглощенным 100 нейтрофилами. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования фагоцитарной активности НГК при кратковременной (60 мин) инкубации образцов крови указывают на широкий диапазон изменений фагоцитарной активности этих клеток. Сущность наблюдаемых процессов, на наш взгляд, заключается в следующем: увеличивается как количество клеток, участвующих в фагоцитозе, так и число дрожжевых клеток, захваченных одним нейтрофилом. Эти изменения указывают на их функциональную активацию. Однако эта активация фагоцитарных реакций может быть расценена и как дисфункция: при активации захвата дрожжевых клеток выявлено снижение способности к перевариванию, что свидетельствует о снижении протеолитической активности лизосомального аппарата НГК.

Увеличение времени экспозиции с МД приводит к дальнейшим изменениям фагоцитарной активности НГК: при продолжении инкубации с МД отмечается дальнейшая сенсibilизация НГК к фагоцитируемым объектам: количество нейтрофилов, принимающих участие в фагоцитозе живых дрожжевых клеток (ИФ), прогрессивно увеличивается. Существенно возрастает и число фагоцитируемых объектов в среднем на одну клетку, особенно значимо при инкубации с рондферрином. Различия между МД и неорондексом по этому параметру, однако, не столь значительны в связи с тем, что ФЧ возрастает и при инкубации с неорондексом, что указывает на возможную роль самого декстрана в модификации фагоцитарной активности гранулоцитов. Проведенное исследование позволило обнаружить влияние самого среднемoleкулярного декстрана на фагоцитарную активность НГК. Так, поступление декстрана в лизосомальный аппарат клетки не снижает ее активности, а при более длительной экспозиции эффект выражается в умеренной, но статистически значимой, активации его функционирования (по показателям индекса фагоцитоза и фагоцитарного числа). Отсутствие четких изменений индекса перевариваемости и процента активных фагоцитов убеждает нас в том, что активация фагоцитоза не связана, по крайней мере, с функционированием лизосомального аппарата НГК и носит неспецифический характер.

Влияние рондферрина и спейсферрона при их добавлении *in vitro* характеризуется рядом особенностей. При кратковременной инкубации со спейсферроном наибольшие изменения претерпело число фагоцитирующих НГК на фоне снижения индекса перевариваемости. Кратковременная инкубация с рондферрином продемонстрировал активацию НГК. При этом она, однако, не затрагивала функционирование лизосомального аппарата (о чем свидетельствует интактный индекс перевариваемости), тогда как продолжение инкубации привело к существенным изменениям фагоцитарной активности, с избыточностью, но в то же время и незавершенностью фагоцитарных реакций в целом, что целесообразно расценивать как металлодекстран-индуцированную дисфункцию.

Таким образом, оба исследуемых МД обладают определенной цитотоксичностью, связанной с возможным включением в клеточный метаболизм хелатов железа, меди и кобальта, входящих в состав препаратов. На основании полученных данных можно заключить, что эффекты инкубации со спейсферроном проявляются раньше, чем у рондферрина, однако, они менее стойкие и, возможно, носят обратимый характер. С учетом изложенного, представляется вероятным развитие оксидативного повреждения, влияющего на структурно-функциональную реорганизацию ядерного и лизосомального аппаратов клеток, отражающего цитотоксичность используемых металлодекстранов.

Литература

1. Дуглас, С. Д. Исследование фагоцитоза в клинической практике / под ред. С. Д. Дуглас, П. Г. Куи. – М.: Медицина, 1983. – 112 с.
2. Карнаухов, В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки / В. Н. Карнаухов. – М.: Наука, 1978. – 209 с.
3. Crouch, S. P., Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin / S. P. Crouch, K. J. Slater, J. Fletcher // Blood. – 1992. – V.80. – P.235–240.
4. Sellak, H., Reactive Oxygen Species Rapidly Increase Endothelial ICAM-1 Ability to Bind Neutrophils Without Detectable Upregulation / H. Sellak, E. Franzini, J. Hakim, C. Pasquier // Blood. – 1994. – Vol. 83. – № 9. – P. 2669–2677.
5. Semenza, G. HIF-1 and mechanism of hypoxia sensing / G. Semenza // Cur. Opinion Biol. – 2001. – Vol.13. – № 2. – P. 161–171.