

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ С МЕТАЛЛОДЕКСТРАНАМИ

Е. В. Воробей¹, А. И. Выговская²

(Учреждение образования «Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова»,

¹кафедра теории и методики физического воспитания,

²кафедра спортивных и медико-биологических дисциплин)

В работе обсуждаются результаты влияния металлодекстрановых препаратов на структурно-функциональные реакции нейтрофильных гранулоцитов крови (НГК) in vitro. Выявлено, что НГК при инкубации со спейсферроном могут находиться в состоянии «функциональной репрессии», тогда как при инкубации с рондферрином отмечается их резкая функциональная активация, возможно, с использованием дополнительных ресурсов (эпигенетического контроля). Полученные данные имеют прикладное значение в понимании механизмов возникновения токсических эффектов препаратов железа для парентерального применения.

Как известно, нейтрофильные гранулоциты крови (НГК) 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. Проведенные изотопные исследования подтвердили, что декстранат железа интернализируется НГК уже в течение одного часа [1]. Такая высокая скорость функциональных реакций требует разработки и соответствующих методических подходов, включая мониторинг динамики процессов, которые отвечали бы требованиям экспресс-анализа. Этой цели соответствует люминесцентный микроспектральный анализ при витальном флуорохромировании клеток красителями, которые избирательно окрашивают клеточные структуры. Прижизненное флуорохромирование клеток позволяет получить целостную картину интегральной клеточной активности. Более того, представляется возможной и раздельная оценка процессов, происходящих в ядре и/или лизосомальном аппарате, поскольку функциональные реакции внутриклеточных структур тесно коррелируют с процессами внутриклеточной коммуникации [2]. Последняя регулируется молекулами-шаперонами (среди них наиболее изучены HSP – heat shock proteins – белки теплового шока), а также посттранскрипционными и посттрансляционными процессами [4]. Зрелые нейтрофилы поступают в циркуляцию с уже запущенными начальными механизмами, реализующими апоптотическую программу этой популяции клеток крови [3]. Поэтому сочетание прижизненного флуорохромирования и исследования специфических функций НГК при экспозиции с ме-

таллодекстранами может предоставить достаточно подробную картину внутриклеточных взаимодействий лизосомального и ядерного аппарата и является перспективным направлением комплексного исследования функциональных реакций этих клеток, что и определяет актуальность настоящего исследования.

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 препарата 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 структурно-функциональных реакций НГК проводилось с помощью люминесцентного 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) [2]. Для каждой клеточной популяции оценивались: 1) интенсивность зеленого свечения (ИЗС), $\lambda = 530$ нм, которая характеризует интенсивность включения флуорохрома в ДНК, отражая состояние хроматина исследуемых ядер: чем выше интенсивность флуоресценции на данной длине волны, тем больше ДНК доступно для интеркалирования с ней этого флуорохрома, тем больше количество активного хроматина (эухроматина); 2) интенсивность красного свечения (ИКС), $\lambda = 640$ нм, которая представляет собой результат флуорохромирования РНК и суправитальной сегрегации красителя в лизосомальном аппарате НГК); 3) отношение ИКС к ИЗС в этой ситуации представляет собой интегральный показатель клеточной активности. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты и их обсуждение

Инкубация образцов крови с неорондексом не привела к значимым структурно-функциональным перестройкам НГК, за исключением умеренного снижения ИЗС при инкубации образцов в течение максимального периода наблюдения (180 минут). В отличие от контрольного эксперимента, при инкубации образцов крови со спейсферроном отмечается прогрессирующее со временем умеренное снижение ИЗС (снижение синтетических процессов в ядре) уже при кратковременном эксперименте. В то же время регистрируется статистически значимый рост ИКС, характеризующий возрастание активности лизосомального аппарата НГК. Умеренное снижение отношения ИКС/ИЗС наблюдалось только при кратковременной инкубации и восстановилось при ее продолжении. Следовательно, полученные результаты убедительно доказывают, что активация лизосомального аппарата носит «изолированный» характер и не связана с функционированием клеточных ядер.

Иная картина наблюдается в исследовании реакций НГК при инкубации образцов крови с рондферрином. Прежде всего, в эксперименте с рондферрином зарегистрировано незначительное снижение ИЗС после продолжения эксперимента (180 минут инкубации). Это указывает на сохранение высокой интенсивности метаболических процессов в ядрах и значительное усиление лизосомальной активности (более чем двукратный рост ИКС), что связано с активной сегрегацией флуорохрома и/или интенсификацией транскрипционных процессов.

С учетом того, что возможность активации генома НГК представляется весьма вероятной, в исследуемых образцах крови могут иметь существенное значение оба процесса. Более того, основное различие между этими препаратами как раз и заключается в том, что параметр ИКС/ИЗС при инкубации образцов крови со спейсферроном снижается, а с рондферрином – возрастает. Снижение этого показателя клеточной активности в эксперименте со спейсферроном указывает на то, что НГК при инкубации с этим препаратом могут находиться в состоянии «функциональной репрессии», тогда как при инкубации с рондферрином отмечается их резкая функциональная активация, возможно, с использованием дополнительных ресурсов (эпи)генетического контроля.

Литература

1. Abboud, S. A Novel Mammalian Iron-regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism / S. Abboud, D. J. Haile. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 26. – P. 19906–19912.
2. Карнаухова, В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки / В. Н. Карнаухова. – М.: Наука, 1978. – 209 с.
3. Iton, K. Expression profile of active genes in granulocytes / K. Iton, K. Okubo, H. Utiyama // Blood. – 1998. – Vol. 92, № 4. – P. 1432–1441.
4. Hightower, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity / L. E. Hightower // Cell. – 1991. – Vol. 66. – P. 191–197.