

РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ У ЩУРІВ У ФІЗІОЛОГІЧНИХ УМОВАХ

Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові та їх взаємозв'язок із показниками перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в статевозрілих нелінійних щурів-самців, які можна використовувати в умовах вивчення механізмів різноманітних патологічних процесів та встановлення ефективності корегувальних програм.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: апоптоз нейтрофілів, перекисне окиснення ліпідів.

ВСТУП. Апоптоз, або програмована смерть клітини, відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу в фізіологічних умовах і при різних патологічних станах [2]. Кількість найрізноманітніших агентів і факторів, що індукують апоптоз клітин, постійно збільшується, і ця обставина посилює й без того думку про неймовірну складність даного процесу. Проте основне положення про початкові етапи індукції апоптозу внаслідок порушення мітохондріального дихання і виникнення оксидативного стресу залишається незмінним [3, 8, 9].

Кожна клітина в складі популяції є складною функціональною саморегулюючою системою, всі компоненти якої взаємозв'язані й взаємозалежні, а сигнальна система в нормі дозволяє утримувати параметри гомеостазу в контролюючих межах. При надпороговій дії адекватна пристосувальна реакція клітини може зумовити перехід на інший рівень функціонування. Запуск відповідної програми гомеостазу на рівні клітини може викликати гіпертрофію, гіперпроліферацію або стимулювати апоптоз [9, 13]. Проте основні фактори, які регулюють перехід клітини з одного стану в інший, враховуючи одночасно і потребу багатоклітинного організму як єдиного цілого, і потребу окремих елементів цього цілого, поки що не визначено. Немає даних про апоптоз нейтрофілів, а також їх взаємозв'язок з інтенсивністю перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту, які в умовах патології є одними з ключових чинників його стимуляції [3, 9, 11].

Метою роботи було з'ясувати рівень апоптозу нейтрофілів тканини печінки, легень та крові у здорових білих статевозрілих щурів та

його взаємозв'язок із показниками ПОЛ та антиоксидантного захисту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на 20 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин анестезували шляхом внутрішньочеревного введення тіопенталу натрію в дозі 80 мг/кг маси щура. Нейтрофіли виділяли з венозної крові методом градієнтного центрифугування [7]. Нейтрофіли виділяли на подвійному градієнті щільності стерильних розчинів фікол-тріумбразу. Щільність верхнього шару градієнта складала 1,075–1,077, а нижнього – 1,093–1,095. Через 30 хв після центрифугування при 1500 об./хв в інтерфазі між двома шарами градієнтів щільності розташовується шар гранулоцитів із чистотою 96–98 %, 2–4 % складають мононуклеари. Клітини акуратно збирали, переносили у стерильні центрифужні пробірки, тричі відмивали стерильним 0,85 % розчином хлориду натрію і розводили цим же розчином до концентрації 5×10^6 клітин/мл. Для виділення нейтрофілів органів промиті у фосфатно-сольовому буфері легень та печінку гомогенізували в магнітному подрібнювачі тканин "SilentCrusher S", гомогенат центрифугували 20 хв при 8000 об./хв. З надосадової рідини виділяли нейтрофіли на градієнті щільності фікол-тріумбразу вищевказаними методами. Для оцінки реалізації апоптозу нейтрофілів легень, печінки та крові використовували ФІТЦ-мічений анексин V, який зв'язується з фосфатидилсеринном на зовнішній поверхні плазмолемі [14], та пропідію йодид, що визначає померлі клітини, з набору реагентів

“ANNEXIN V FITC” (“Beckman Coulter”, Франція). Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL (“Beckman Coulter”, Франція).

Визначали: у крові – церулоплазмін та SH-групи [5], в гомогенатах тканин легень та крові – вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ [1], активність супероксиддисмутази (СОД) [4] і каталази [6].

Отриманий цифровий матеріал обробляють методом варіаційної статистики. Достовірність відмінностей визначали з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Функціональні особливості нейтрофілів зумовлюють пріоритетність комплексного підходу в оцінці стану їх популяції. Це можна пояснити відсутністю цілісної інформації про взаємозв'язок основних подій у житті цих ефекторних клітин – міграції, продукування активних форм кисню, апоптозу, що створює труднощі щодо встановлення участі та ролі нейтрофілів у різних патологічних процесах [12].

Як видно з таблиці 1, у здорових статевозрілих щурів-самців ранній апоптоз нейтрофілів у легенях перебував у межах від 0,44 до 0,58 % ($p < 0,05$), у печінці – від 0,13 до 0,35 % ($p < 0,05$), в крові – від 0,39 до 0,51 % ($p < 0,05$). При цьому ступінь раннього апоптозу нейтрофілів у печінці був статистично достовірно нижчим, ніж у легенях та крові ($p < 0,001$). Потрібно зауважити, що рівень раннього апоптозу в легенях та крові практично не відрізнявся.

Кореляційний аналіз ступеня раннього апоптозу нейтрофілів легень із досліджуваними біохімічними та імунологічними показниками показав (рис. 1) наявність позитивної кореляції слабкої сили із вмістом в гомогенаті легень СОД та середньої сили із вмістом у гомогенаті легень ТБК-активних продуктів ПОЛ і каталази та вмістом SH-груп ($p < 0,01$) і церулоплазміну в крові. У свою чергу, ранній апоптоз нейтрофілів крові негативно корелював із вмістом СОД, ТБК-активних продуктів ПОЛ,

каталази (зв'язки слабкої сили) і церулоплазміну (середній зв'язок) та позитивно корелював із вмістом SH-груп (сильний зв'язок) у крові.

У печінці ступінь раннього апоптозу нейтрофілів позитивно сильно корелював із вмістом церулоплазміну ($p < 0,01$) та слабо з рівнем SH-груп у сироватці крові, негативно слабкої сили зв'язок виявлено із вмістом в гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів ПОЛ і СОД, встановлено негативну кореляцію середньої сили із вмістом каталази в гомогенаті печінки.

Одержані результати свідчать про те, що ранній апоптоз нейтрофілів більш притаманний легеням, а менше – печінці. Можна припустити, що у легенях нейтрофіли відіграють ключову роль у підтриманні локального імунітету і більшою мірою контактують із речовинами антигенної природи, які здатні стимулювати в них апоптоз. Тому одним з механізмів, що дозволяє контролювати запальні реакції дихальних шляхів, можна вважати рівень апоптозу нейтрофілів, який, найімовірніше, збільшується за рахунок дії проапоптичних факторів, що утворюються у вогнищі запалення.

В останні роки увагу клініцистів привертає вивчення вільнорадикального окиснення ліпідів мембран як регулятора фізіологічних процесів. Цей процес властивий нормальним тканинам і відбувається зазвичай при побудові ліпідних мембранних структур, їх оновленні, у ході біосинтезу ряду гормонів. Надмірна активація процесів ПОЛ призводить до порушення структури мембран, ліпідного обміну, проявляє токсичний вплив на тканини, сприяє посиленню лізису, окисненню сульфгідрильних груп білків і зумовлює розвиток структурних змін при захворюваннях легень та інших органів і систем організму [4, 9]. Регуляція нормальної концентрації перекису ліпідів у біологічних мембранах відбувається внаслідок збалансованої взаємодії реакцій утворення цих продуктів – реакцій оксидації та механізмів контролю, які призводять до пригнічення їх утворення, – реакцій антиоксидації.

Таблиця 1 – Ступінь апоптозозмінених нейтрофілів печінки, легень та крові в нормі ($M \pm m$)

Орган	Апоптоз ранній, % (n=20)	Апоптоз пізній, % (n=20)	Неуражені клітини, % (n=20)
Легені	0,51±0,03	0,60±0,15	97,8±0,80
p ₁	<0,001	>0,05	>0,05
Печінка	0,24±0,05	0,79±0,15	98,20±0,57
p ₂	<0,001	<0,001	>0,05
Кров	0,45±0,06	0,42±0,07	98,93±0,16
p ₃	>0,05	<0,01	>0,05

Примітка. p₁ – достовірність відмінностей показників у печінці порівняно з легенями; p₂ – достовірність відмінностей показників у крові порівняно з печінкою; p₃ – достовірність відмінностей показників у крові порівняно з легенями.

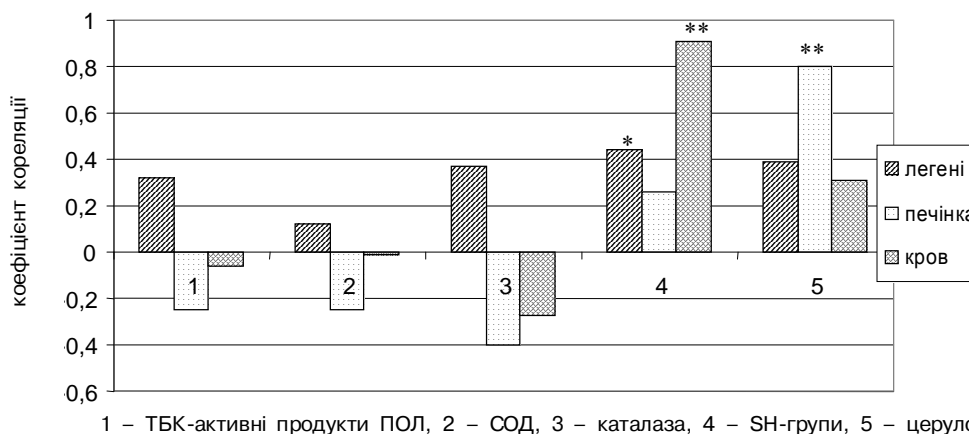


Рис. 1. Кореляція ступеня раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові з показниками перекисного окиснення та антиоксидантного захисту в нормі.

Примітка. *,** – достовірність відмінностей коефіцієнтів кореляції (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$).

Аналіз кореляцій показав, що ступінь раннього апоптозу нейтрофілів у легенях збільшується зі зростанням у крові вмісту продуктів ПОЛ і активності ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту. В легенях нейтрофіли найшвидше реагують на зміну оксидантно-антиоксидантного гомеостазу, зумовлюючи накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та поглиблюючи оксидативний стрес, що відповідає сучасному баченню основних механізмів стимулювання апоптозу в патологічних умовах [12]. В нормальних фізіологічних умовах деструктивна дія продуктів ПОЛ стримується багаторівневою системою антиоксидантного захисту, що показано в нашому дослідженні.

На відміну від процесів вільнорадикального окиснення в легенях, печінці та крові спостерігаються однонаправлені зміни перекисного окиснення та антиоксидантного захисту: в міру зростання апоптозу нейтрофілів у печінці й крові відбуваються зниження рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ, СОД і каталази та зростання вмісту SH-груп та церулоплазміну. Оскільки печінка має захисні антиоксидантні системи, які визначають стійкість гепатоцитів до дії вільних радикалів у різних зонах печінкових часточок, у гомогенаті печінки відмічають найнижчий рівень раннього апоптозу нейтрофілів. Можна припустити, що в печінці ключову роль у підтриманні локального імунітету відіграють інші клітини, зокрема клітини Купфера, які є основою формування запальних реакцій шляхом продукування цитокінів та стимуляції апоптозу.

Потрібно зауважити, що рівень раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові позитивно корелював із вмістом у крові вільних SH-груп та церулоплазміну. Відомо, що SH-групи білкових молекул, в основному віднов-

леного глутатіону, одними з перших беруть участь у нейтралізації вільних радикалів та токсинів [9]. Цей процес відбувається безперервно, що супроводжується посиленням утворенням відновленого глутатіону, який, очевидно, у фізіологічних умовах пропорційний до накопичення вільних радикалів, тому позитивно корелює зі ступенем первинного апоптозу. Щодо церулоплазміну відомо, що він синтезується переважно паренхіматозними клітинами печінки, меншою мірою – макрофагами і лімфоцитами, та захищає організм від накопичення вільних радикалів, що обґрунтовує сильний кореляційний зв'язок між ступенем раннього апоптозу нейтрофілів та вмістом церулоплазміну в гомогенаті печінки ($p < 0,01$).

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові у статевозрілих нелінійних щурів-самців, які можна використовувати в умовах вивчення механізмів різноманітних патологічних процесів та встановлення ефективності корегувальних програм.

2. Посилення раннього апоптозу нейтрофілів гомогенату легень у фізіологічних умовах пов'язане зі збільшенням у крові продуктів ПОЛ, що активує процеси ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантного захисту. Ранній апоптоз нейтрофілів печінки здорових щурів менш виражений за рахунок захисних властивостей ферментів антиоксидантної системи, зокрема церулоплазміну. В крові антиоксидантні властивості найбільше проявляють SH-групи, які одні з перших беруть участь у нейтралізації вільних радикалів та токсинів.

У перспективі стан раннього апоптозу нейтрофільних гранулоцитів буде досліджуватися в умовах експериментального гострого ураження легень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Барышников А. Ю. Fas/Apo-1 антиген – молекула, опосредующая апоптоз / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин // Гематология и трансфузиология. – 1995. – № 6. – С. 35–38.
3. Зенков Н. К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. – М. : Наука “Интерпериодика”, 2001. – 343 с.
4. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – 280 с.
5. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
6. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / под ред. Дж. Натвиг и др. – М. : Медицина, 1980. – 280 с.
8. Лю Б. Н. Старение, возрастные патологии и канцерогенез (кислородно-перекисная концепция) / Б. Н. Лю. – Алмата : Деуир, 2003. – 808 с.
9. Октябрьский О. Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – 72, № 2. – С. 158–174.
10. Пасечник А. В. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза / А. В. Пасечник, В. А. Фролов, Н. Г. Гвоздь // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2004. – № 1 (25). – С. 103.
11. Kam P. C. Apoptosis: mechanisms and clinical implications / P. C. Kam, N. I. Ferch // Anaesthesia. – 2000. – 55. – P. 1081–1093.
12. Kantari C. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity / C. Kantari, M. Pederzoli-Ribeil, V. Witko-Sarsat // Contrib. Microbiol. – 2008. – 15. – P. 118–146.
13. Strasser A. Apoptosis signaling / A. Strasser, L. O'Connor, V. M. Dixit // Annu. Rev. Biochem. – 2000. – № 69. – P. 217–245.
14. Van Engeland M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. Ramaekers // Cytometry. – 1998. – 31. – P. 1–9.

М. И. Марущак

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Резюме

Установлены физиологические пределы раннего апоптоза нейтрофилов легких, печени и крови и их взаимосвязь с показателями перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у половозрелых неллинейных крыс-самцов, которые можно использовать в условиях изучения механизмов различных патологических процессов и установления эффективности корректирующих программ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз нейтрофилов, перекисное окисление липидов.

M. I. Marushchak

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES AND NEUTROPHILS APOPTOSIS IN RATS IN PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Summary

Physiological levels of neutrophils early apoptosis in the lung, liver and blood and their relationship with indices of lipid peroxidation and antioxidant protection in rats are established. It can be used in studying of the mechanisms of various pathological processes and effectiveness of corrective programs.

KEY WORDS: neutrophils apoptosis, lipid peroxidation.

Отримано 18.04.11

Адреса для листування: М. І. Марущак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.