

изменения уровней диеновых конъюгатов и кетонов, активности пероксидазы и насыщенности организма аскорбинатом достоверно отличался от изменений во 2-й и 3-й группах. Включение в лечебный комплекс микроэлемента селена привело к снижению неадекватно активированных процессов ПОЛ, преимущественно на этапе образования первичных продуктов ПОЛ, и повышению исходно сниженной активности антиоксидантного фермента пероксидазы. Во 2-й и 3-й группах благоприятная динамика изучавшихся показателей отсутствовала.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об активации процессов ПОЛ и угнетении активности ферментов антиоксидантной защиты у больных ХБ по сравнению со здоровыми лицами. Применение физиологических доз микроэлемента селена в сочетании с традиционными антиоксидантами позволяет достигнуть снижения уровня свободнорадикального окисления и повышения активности антиоксидантных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Г.Б., Мехдиев М.А., Садыков С.Т. и др. // Материалы по биохимии витамина Е и селена и их применению в медицине и животноводстве.— Киев, 1973.— С.4—5.
2. Александров О.В., Лурье Б.Л., Гноевых В.В. и др. // Пульмонология.— 1992.— № 3.— С.13—16.
3. Амануни В.Г., Сафарян М.Д. // Журн. exper. и клин. мед.— 1982.— № 5.— С.414—418.
4. Губенко Г.А., Погрибный И.П. // Укр. биохим. журн.— 1985.— № 6.— С.51—55.
5. Клейнер А.И., Колодуб Ф.А., Кашкалда Д.А. // Врач. дело.— 1990.— № 6.— С.98—100.
6. Петрович Ю.Л., Подорожная Р.П. // Успехи соврем. биол.— 1987.— № 2.— С.323—325.
7. Пилипчук С.Н. // Врач. дело.— 1988.— № 8.— С.62—67.
8. Политова Л.Н., Ульянова Г.И., Аноненко А.А., Гранова Л.В. // Биоантиоксидант.— Черноголовка, 1986.— Т.2.— С.82—83.
9. Редчиц И.В., Селихова Л.Г., Гольденберг Ю.М. и др. // Укр. биохим. журн.— 1978.— № 5.— С.659—671.

Поступила 21.03.94.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616-008.92

А.В.Бизюкин, С.К.Соодаева

НОВЫЙ МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

НИИ пульмонологии, Москва

NEW TECHNIQUE FOR PHAGOCYTE OXYGEN METABOLISM STUDY

A.V.Bizukin, S.K.Sohodajeva

S u m m a r y

The use possibility of vital fluorochromes like 2,7-dichlorfluorescein acetate, dihydrorhodamine, and hydroethidine was discussed to study phagocyte oxygen metabolism. The sensitivity of the fluorochromes to reactive oxygen species (ROS) was studied in model radical producing systems. The data about interaction in molar ratio 1:1 between superoxide radical and hydroethidine were obtained. The fluorochrom sensitivity to proteins, phospholipids, DNA, and pH was studied to estimate the artefact probability. Correlation between extra- and intracellular productions of ROS in peritoneal and alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes was evaluated. Possible mechanisms and the result valuability are discussed.

Р е з ю м е

Обсуждается возможность использования витальных флюорохромов 2,7-дихлорфлюоресциндацетата, дигидрородамина 123 и гидроэтидина для изучения окислительного метаболизма фагоцитирующих клеток. Изучена чувствительность данных красителей к активным формам кислорода (АФК) в модельных системах. Получены данные, что с супероксидными радикалами гидроэтидин взаимодействует в молярном соотношении 1:1. Для оценки вероятности получения ложноположительных результатов была исследована чувствительность флюорохромов к белкам, фосфолипидам, ДНК и изменению pH. Измерено соотношение вне- и внутриклеточной продукции АФК в перитонеальных, альвеолярных макрофагах и полиморфно-ядерных лейкоцитах. Обсуждаются возможные механизмы и значимость полученных результатов.

Фагоцитирующие клетки играют важную роль в патогенезе многих заболеваний. С изменением активности свободнорадикальных процессов этих клеток связаны такие патологии, как воспаление, пневмокониозы, фиброз, аутоиммунные состояния, канцерогенез и др. [4,5]. Поэтому интерес к изучению свободнорадикального статуса фагоцитов сегодня проявляют врачи самых разных специальностей. Это одно из перспективных направлений современной медицины.

Традиционно полагают, что основным источником активных форм кислорода (АФК) являются ферменты НАДФН-оксидаза, миелопероксидаза, циклокси- и липоксигеназы и дыхательная цепь митохондрий. Известно, что часть радикалов продуцируется внеклеточно, чем и объясняется цитотоксическая функция фагоцитов. Однако часть радикалов может продуцироваться и внутриклеточно за счет разобщения дыхательной цепи митохондрий или, возможно, ферментов эндоплазматического ретикулума (рис.1) [1].

Различные патологические состояния связаны как с гипо-, так и с гиперпродукцией АФК. Гипопродукция радикалов приводит к тому, что у пациента не развивается нормальный иммунный ответ. Гиперпродукция АФК может привести к повреждению ДНК, белков, липидов, а следовательно, и гибели самих клеток. Еще в 1991 г. у нас возник вопрос: какие АФК (продуцируемые внутри или наружу клетки) определяют развитие того или другого патологического состояния? В настоящее время большинство исследований окислительного метаболизма фагоцитов касается внеклеточной генерации АФК. Традиционные методы (спектрофотометрический по восстановлению цитохрома С или с помощью хемилюминесценции) позволяют изучать только внеклеточную продукцию АФК. Для измерения внутриклеточной генерации АФК используются флюоресцентные красители 2,7-дихлорфлюоресцин диацетат (ДХФН-ДА), дигидрородамин 123 (ДГР-123) и гидроэтидин (ГЭ), способные проникать внутрь фагоцитов и окисляться там АФК, изменяя при этом свои флюоресцентные свойства [11,14] (рис.2).

Целью данного исследования явилась оценка возможностей использования флюорохромоов ДХФН-ДА,

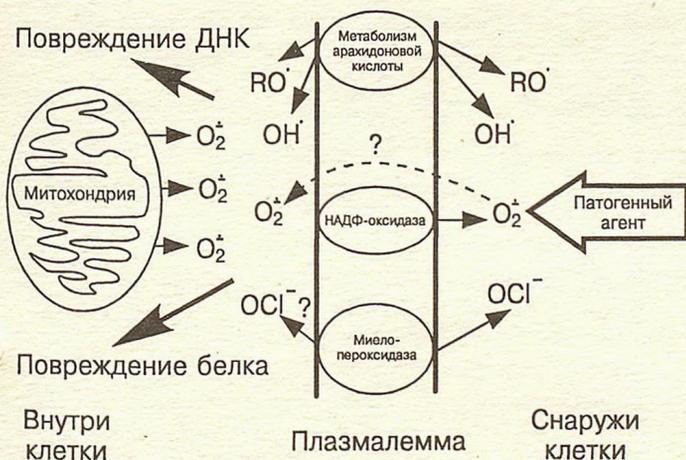


Рис.1. Продукция активных форм кислорода в фагоцитах.

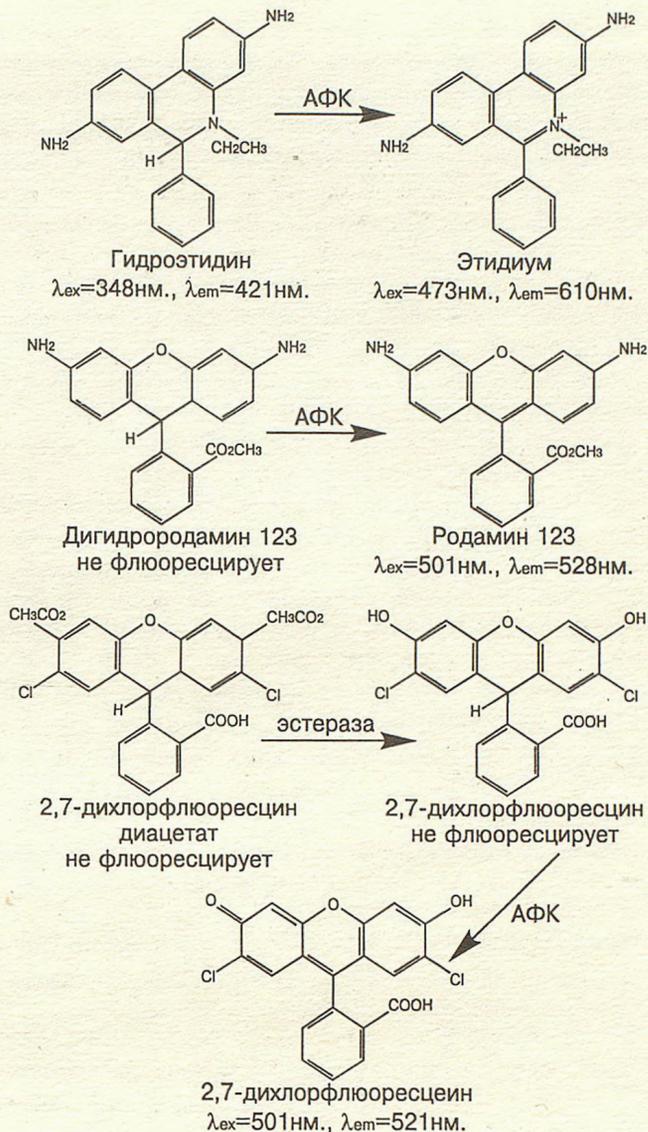


Рис.2. Схемы превращения флюоресцентных красителей после взаимодействия с активными формами кислорода.

ДГР-123 и ГЭ для сравнительного изучения роли вне- и внутриклеточной продукции АФК в окислительном метаболизме фагоцитирующих клеток.

Принцип метода измерения внутриклеточной продукции АФК основан на способности витальных флюорохромоов ГЭ, ДХФН-ДА и ДГР-123 накапливаться внутри клеток и после взаимодействия с АФК превращаться, соответственно, в этидиум, 2,7-дихлорфлюоресцеин (ДХФ) и родамин 123 (Р-123). Все красители были синтезированы и любезно предоставлены нам В.И.Алексеевой (НИИ органических полупродуктов и красителей). Маточные растворы флюорохромоов были приготовлены в диметилформамиде и хранились при -18°C .

Превращение флюорохромоов под воздействием свободных радикалов кислорода изучали в модельных системах: влияние гидроксильных радикалов ($\text{OH}\cdot$) — в модифицированном реактиве Фентона [6], влияние супероксидных радикалов ($\text{O}_2^{\cdot-}$) — в ксантин-ксантин-оксидазной реакции. Активность ксантинооксидазы определяли по образованию мочевиной кислоты [13]. В

контрольную пробу добавляли 20 мкг/мл супероксид-дисмутазы. Количество O_2^- радикалов определяли по восстановлению цитохрома С из расчета, что одна молекула O_2^- восстанавливает одну молекулу цитохрома С [12]. Источником синглетного кислорода служил раствор $NaOCl-H_2O_2$ [3]. Липосомы из суммарной фракции яичных фосфолипидов (0,1 мг/мл) получали по известной методике [8].

Перитонеальные, альвеолярные макрофаги и полиморфно-ядерные лейкоциты крови доноров выделяли общепринятым способом [9,10].

Для измерения внутриклеточной продукции АФК суспензию клеток в растворе Хенкса без фенолового красного (рН=7,4) инкубировали 15 минут с 10^{-4} М ГЭ, тщательно отмывали центрифугированием (5 мин. при 800 g и $+4^\circ C$) в 20-кратном избытке раствора Хенкса, окончательно ресуспендировали до концентрации 10^6 кл/мл и стимулировали форболмиристат-ацетатом (ФМА). Образование этидиума из ГЭ в клетках регистрировали, измеряя интенсивность флюоресценции этидиума при длинах волн λ_{em} — 610 нм, λ_{ex} — 473 нм на спектрофлуориметре MRF-44 (Perkin-Elmer) в сантиметровых кварцевых кюветках, термостатированных при $37^\circ C$ и постоянном перемешивании [2].

Свойство ГЭ быстро проникать внутрь фагоцитов и очень медленно вытекать из них (только 4,5% красителя вытекает из клеток за один час инкубации) навело нас на мысль модифицировать этот метод и использовать ГЭ для измерения соотношения вне- и внутриклеточной продукции активных метаболитов кислорода в различных фагоцитирующих клетках.

Для сравнения вне- и внутриклеточной продукции АФК готовили две пробы клеток. Первая — нагруженные гидроэтидином фагоциты тщательно отмывали от избытка флюоресцентного красителя и затем стимулировали ФМА. Таким образом определяли только внутриклеточную генерацию АФК. Вторая проба содержала нагруженные ГЭ клетки, не отмывые от избытка красителя. Клетки активировали такой же концентрацией ФМА. При этом измеряли как внутри-, так и внеклеточную (т.е. суммарную) продукцию АФК. Величину внеклеточной продукции АФК получали вычитая из значения суммарной продукции величину внутриклеточной продукции радикалов [2].

На первом этапе работы требовалось выяснить, обладают ли исследуемые нами флюоресцентные красители специфической чувствительностью к какому-либо одному виду радикалов и возможно ли использовать их для количественного определения продукции АФК в клетках? Для того была изучена чувствительность флюорохромов: ГЭ, 2,7-ДХФ и ДГР-123 к АФК в модельных системах, продуцирующих только какой-либо один вид радикалов, а также к $NaOCl$. Определялось количество молекул красителя (в процентах), изменивших свои флюоресцентные свойства после взаимодействия с АФК. Начальная концентрация флюорохромов была 10^{-6} М. Концентрацию окисленной формы красителя определяли по калибровочной кривой, построенной по стандартным разведениям флюорохромов. Результаты представлены на

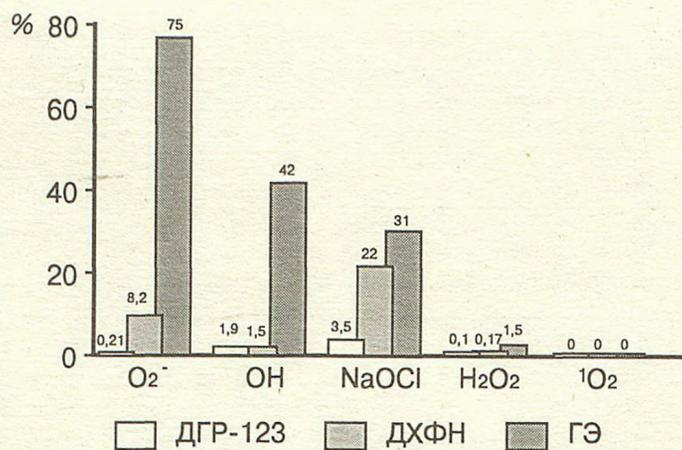


Рис.3. Сравнительная чувствительность 2,7-дихлорфлюоресцина, дигидрорамина-123 и гидроэтидина к активным формам кислорода, (ДГР-123 — дигидрорамина 123; ДХФН — 2,7-дихлорфлюоресцин; ГЭ — гидроэтидин; O_2^- — супероксид анион-радикал; ОН — гидроксильный радикал; $NaOCl$ — гипохлорит Na; H_2O_2 — пероксид водорода; 1O_2 — синглетный кислород).

рис.3. Флюорохромы в использованных концентрациях не оказывали ингибирующего влияния на ксантиноксидазу.

Было также проанализировано сколько молекул O_2^- превращает одну молекулу красителя во флюоресцирующую форму. Одну молекулу ДГР-123 превращает в родамин 370 молекул O_2^- , одну молекулу ДХФН в ДХФ — 15 молекул O_2^- , ГЭ взаимодействует с O_2^- в молярном соотношении 1:1 (рис.4).

Чтобы оценить вероятность получения ложноположительных результатов было исследовано насколько специфичны использованные флюоресцентные зонды именно к АФК и не изменяют ли они свои люминесцентные свойства под влиянием каких-либо других клеточных факторов, отличных от АФК.

Установлено, что ДГР-123 может превращаться в Р-123 не только после контакта с АФК, но и при взаимодействии с полианионом — бычьим сыворо-



Рис.4. Соотношение между чувствительностью цит. С. к супероксидным радикалам и превращением гидроэтидина в этидиум в ксантин-ксантиноксидазной реакции: ксантиноксидаза — 2,5 ед. акт/мл; цит. С. окисл. — $5 \cdot 10^{-5}$ М; каталаза — 0,8 мг/мл; гидроэтидин — $3 \cdot 10^{-5}$ М; ксантин — $0,8 \cdot 10^{-6}$ М, $1,7 \cdot 10^{-6}$ М, $2,7 \cdot 10^{-6}$ М, $3,4 \cdot 10^{-6}$ М: в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН=7,4).

Т а б л и ц а

Соотношение вне- и внутриклеточной продукции АФК в различных фагоцитирующих клетках, активированных ФМА

Фагоциты	Внутриклеточная генерация АФК, %	Внеклеточная генерация АФК, %
Перитонеальные макрофаги крыс	28±5	72±7
Альвеолярные макрофаги крыс	11±2	89±5
Нейтрофилы крови здоровых доноров	19±7	81±7

точным альбумином — БСА (0,5 мг/мл) и поликаатионом — протамин сульфатом (0,5 мг/мл). ДХФН способен превращаться в ДХФ в присутствии 0,1 мг/мл БСА. Протамин (0,5 мг/мл), ДНК (0,05 мг/мл) и липосомы не влияли на превращение ДХФН в ДХФ. Белки, ДНК, фосфолипиды и изменение рН от 4 до 8 не влияли на превращение ГЭ в этидиум. Таким образом, использование ДХФН-ДА и ДГР-123 может привести к получению ошибочных результатов. ГЭ лишен этих недостатков. Поэтому все дальнейшие исследования были сделаны с использованием именно этого люминофора.

Данные о соотношении вне- и внутриклеточной генерации активных метаболитов кислорода в альвеолярных и перитонеальных макрофагах крыс, а также в нейтрофилах крови здоровых доноров, полученные с использованием ГЭ, представлены в таблице. При активации различных типов лейкоцитов внутриклеточная генерация АФК составляет приблизительно 20% (11—28%). Внутриклеточная продукция АФК в фагоцитирующих клетках чувствительна к цианиду (NaCN). Так, в перитонеальных и альвеолярных макрофагах крыс, стимулированных ФМА, 3—5-минутное предварительное инкубирование клеток с 1 мМ NaCN снижало внутриклеточную генерацию радикалов на 85±6% и 98±4%, соответственно. Аналогичная концентрация NaCN снижает внутриклеточную продукцию метаболитов кислорода в нейтрофилах, стимулированных ФМА, только на 47±5%. Неактивированные полиморфно-ядерные клетки на присутствие NaCN реагировали незначительным усилением спонтанной внутриклеточной генерации АФК. В перитонеальных макрофагах и нейтрофилах внеклеточная продукция АФК чувствительна к цианиду в меньшей степени, чем внутриклеточная. Так, предварительное инкубирование фагоцитов с 1 мМ NaCN снижало внеклеточную генерацию радикалов в перитонеальных макрофагах на 20—40%, а в нейтрофилах крови здоровых доноров на 22±9%. Альвеолярные макрофаги в большей степени чувствительны к цианиду, внеклеточная генерация АФК снижается в них на 82—86%.

Среди использованных нами трех флюоресцентных красителей наиболее удобным для определения внутриклеточной генерации АФК оказался гидроэтидин.

Известно, что альвеолярные макрофаги являются наиболее выраженными аэробами с интенсивно работающими митохондриями, в то время как перитонеальные макрофаги — анаэробы с преобладанием гликолиза [7]. Разница в соотношении вне- и внутриклеточной продукции АФК в этих клетках, возможно, объясняется различиями в их окислительном метаболизме.

Значительная зависимость внутриклеточной генерации АФК от цианида подтверждает, что такие радикалы действительно образуются в цианидчувствительных системах, вероятнее всего, в митохондриях [1,5].

Реакция на цианид является также критерием качества данного метода. То обстоятельство, что внутриклеточная генерация АФК в большей степени чувствительна к NaCN, чем наружная, доказывает, что ГЭ проникает внутрь клеток, и превращение его в этидиум происходит внутри клетки.

Данный методический подход изучения соотношения вне- и внутриклеточной продукции АФК может быть полезным для более полного понимания механизмов генерации АФК при различных патологиях и найдет более широкое применение в клинической практике.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Афанасьев И.Б. Кислородные радикалы в биологических системах // Хим.— фарм. журн.— 1985.— № 1.— С.11—23.
2. Бизюкин А.В., Ягмуров Б.Х., Тимофеев А.А., Соодаева С.К. Свободнорадикальные процессы на отдаленных сроках радиационного воздействия // Пульмонология.— 1993.— № 3.— С.67—70.
3. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. // Свободные радикалы в живых системах.— М., 1991.— С.9—19; 33—35; 168—172.
4. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов.— М.: Высшая школа, 1989.— С.170—179.
5. Коркина Л.Г., Величковский Б.Т. Роль свободных радикалов кислорода в пылевой патологии легких // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине.— Рига: РМИ, 1988.— С.153—163.
6. Коркина Л.Г., Деева И.Б., Величковский Б.Т. Как поливинилпиридин-N-оксид уменьшает цитотоксический эффект SiO₂? // Гиг. труда.— 1988.— № 1.— С.8—10.
7. Фрейдлин И.С. Система мононуклеарных фагоцитов.— М.: Медицина, 1984.— С.74—90.
8. Arnchold J., Deev A.I. A simple procedure for preparing of REV-liposomes // Pharmacie.— 1985.— № 11.— P.808—809.
9. Bechard D.E., Fisher B.J., Kessler F.K., Carchman R.A., Fowler A.A. Macrophage spreading disparity: alveolar vs peritoneal // J. Clin. Lab. Immunol.— 1988.— Vol.26.— P.67—71.
10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest.— 1968.— Suppl.97.— P.77.
11. Kobzik L., Godleski J., Brain J. Oxidative metabolism in alveolar macrophages. Analysis by flow cytometry // J. Leukocyte Biol.— 1990.— Vol.47, № 4.— P.295—303.
12. McCord J.M. The superoxide free radicals: its biology and pathology // Surgery.— 1983.— Vol.24, № 3.— P.412—414.
13. Michelson A.M., McCord J.M., Fridovich I. Superoxide and superoxide dismutases.— London: Acad. Press, 1977.— P.15—164.
14. Rothe G., Oser A., Valet G. Dihydrorhodamine 123; a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes // Naturwissenschaften.— 1988.— Bd 75.— S.354—355.