

Генерация активных форм кислорода нейтрофилами при взаимодействии с монокарбоксицеллюлозой с различным содержанием карбоксильных групп

А. А. Крюков, Г. Н. Семенкова, В. Е. Капуцкий, С. Н. Черенкевич

Кафедра биофизики Белгосуниверситета
Просп. Фр. Скорины 4, Минск, 220050, Беларусь

Методом люминолзависимой хемилюминесценции изучено влияние монокарбоксицеллюлозы (МКЦ) с различным содержанием карбоксильных групп на кислородактивирующие системы нейтрофилов крови здоровых людей. Введение в суспензию клеток МКЦ приводит к уменьшению выхода активных форм кислорода (АФК) на различных стадиях процесса активации клеток адгезией к стеклу и частицами латекса. Полученный эффект не зависит от степени адгезивности нейтрофилов к подложкам из МКЦ и определяется только концентрацией СООН-групп в МКЦ: повышение содержания карбоксильных групп от 0,26 до 16 % приводит к снижению выхода АФК в нейтрофилах. МКЦ вызывает уменьшение активности миелопероксидазы (МПО) в модельной системе МПО—Н₂O₂—люминол.

Введение. Монокарбоксицеллюлоза (МКЦ) является химическим производным природного высокомолекулярного соединения — целлюлозы. Как целлюлоза, так и МКЦ обладают высокой механической прочностью, значительной поглотительной и сорбционной способностью. Благодаря этим свойствам оба полимера используют в медицине в качестве основы для перевязочных средств [1, 2]. В отличие от целлюлозы МКЦ рассасывается в тканях организма, что обуславливает возможность применения этого материала при хирургических операциях [3]. Показано, что МКЦ нетоксична для организма, оказывает кровоостанавливающее и антибактериальное действие, стимулирует пролиферативную функцию соединительной ткани [4, 5].

Одним из важных аспектов, на который следует обращать внимание при создании новых лекарственных средств, является их действие на компоненты крови. Нужно отметить, что в литературе отсутствуют данные о молекулярно-клеточных механизмах взаимодействия МКЦ с фагоцитами кро-

ви, участвующими в обеспечении неспецифической защиты организма. Одним из основных проявлений функциональной активности фагоцитов является усиленное образование активных форм кислорода (АФК) [6].

Целью настоящей работы было исследование влияния МКЦ с различным содержанием карбоксильных групп на активирующие кислород системы нейтрофилов крови.

Материалы и методы. В работе использованы среда Эрла (собственного приготовления), кристаллическая целлюлоза и пероксидаза хрена («Олайн», Латвия), люминол («Sigma», США), остальные реактивы отечественного производства. МКЦ применяли в виде порошка (микрогранулы, размер частиц 50 мкм) и прозрачных пленок толщиной 150 мкм, а также пленки из целлюлозы, полученные по методу, описанному в работе [3].

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых людей центрифугированием в градиенте плотности фикол-верографина [7]. Примесь эритроцитов удаляли с помощью гемолитического шока. Клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л растворе NaCl и ресуспендировали в среде Эрла

(рН 7,4). Содержание нейтрофилов в полученной суспензии составляло не менее 96 %.

Генерацию АФК изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с применением биохемилюминометра БХЛ-1 (Беларусь). Измерения проводили в сбалансированном солевом растворе Эрла (рН 7,4) при температуре 37 °С. Перед началом измерений в анализируемую пробу объемом 2 мл добавляли $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола. Количество нейтрофилов в 1 мл составляло $2 \cdot 10^9$. При изучении ЛЗХЛ клеток в процессе адгезии к пленкам из целлюлозы или МКЦ суспензию нейтрофилов наслаивали на дно кюветы (диаметром 40 мм), полностью покрытое прозрачной пленкой из изучаемого материала. Целлюлозу и МКЦ в виде микрогранул добавляли к суспензии клеток в количестве 0,5 мкг/мл.

Степень адгезивности клеток к различным подложкам изучали следующим образом: стеклянные пластинки, пленки МКЦ либо пленки целлюлозы помещали в чашки Петри, добавляли 2 мл суспензии нейтрофилов и в течение 1 ч инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Затем пленки промывали в среде Эрла (рН 7,4) и с помощью светового микроскопа и камеры Горяева подсчитывали количество клеток, адгезированных на единицу площади.

Влияние целлюлозы и МКЦ с различным содержанием СООН-групп на продукцию АФК в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена ($3,6 \cdot 10^{-9}$ моль/л) или миелопероксидазой (МПО) нейтрофилов крови человека, исследовали в модельных системах, содержащих люминол в концентрации $1,25 \cdot 10^{-5}$ моль/л и пероксид водорода — $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Препараты на основе целлюлозы и ее производных добавляли в пробы до начала иницирования хемилюминесценции. МПО выделяли из нейтрофилов трехкратным замораживанием — размораживанием суспензии нейтрофилов и последующим центрифугированием в течение 10 мин (8000 g) для осаждения крупных клеточных обломков. В анализируемую пробу добавляли 200 мкл супернатанта, полученного после разрушения и центрифугирования клеточной суспензии ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл).

При математической обработке результатов определяли среднюю величину $\langle x \rangle$ для группы измерений. Полученные результаты x представлены в виде:

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

где α — среднее квадратичное отклонение; t_{α} — коэффициент Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведе-

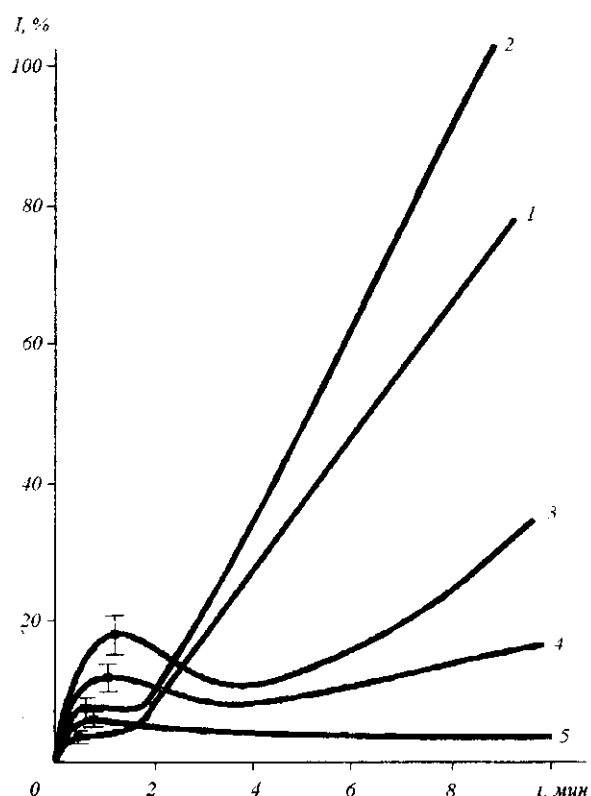


Рис. 1. Кинетические характеристики люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов при адгезии к стеклу (1), пленкам из целлюлозы (2) и монокарбоксицеллюлозы с содержанием карбоксильных групп: 3,9 % (3); 6,9 % (4); 16 % (5)

ны типичные кинетические кривые ЛЗХЛ нейтрофилов при адгезии на стекло, а также на прозрачные пленки из целлюлозы и МКЦ с различным содержанием карбоксильных групп. Видно, что внесение суспензии нейтрофилов в стеклянную кювету, дно которой покрыто пленкой из целлюлозы, приводит к индуцированию ЛЗХЛ (кривая 2), параметры которой такие же, как в случае адгезии клеток к стеклу (кривая 1). Механизмы ЛЗХЛ нейтрофилов при адгезии к стеклу описаны нами ранее [6, 8]. При анализе формы кинетической кривой ЛЗХЛ, обусловленной адгезией нейтрофилов к стеклу, установлено, что процессы генерации АФК в этих клетках протекают в две стадии. Первая стадия — результат функционирования НАДФН-оксидазы, ассоциированной с плазматической мембраной. Вторая стадия отражает вовлечение в образование АФК помимо НАДФН-оксидазы МПО [9]. Из рис. 1 (кривые 3—5) следует, что при адгезии нейтрофилов на пленки из МКЦ суммарный выход ЛЗХЛ значительно ниже, чем в случае

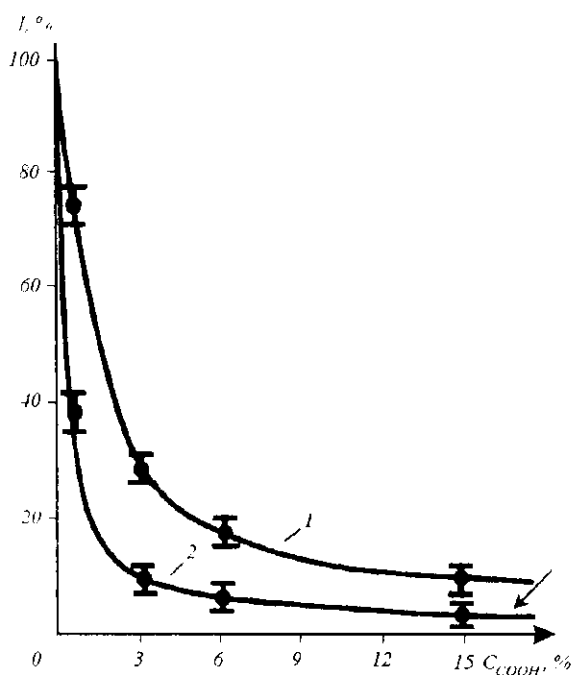


Рис. 2. Влияние монокарбоксилцеллюлозы с различным содержанием СООН-групп на индуцированную латексом генерацию активных форм кислорода в нейтрофилах (1) и люминолзависимую хемилюминесценцию в системе H_2O_2 —люминол—миелопероксидаза (2)

адгезии клеток на стекло или целлюлозу. При этом в зависимости от содержания карбоксильных групп в МКЦ изменяется соотношение значений интенсивностей ЛЗХЛ на первой и второй стадиях кинетической кривой. При концентрации СООН-групп, равной 16 %, увеличение интенсивности ЛЗХЛ на второй стадии процесса вообще не наблюдается.

Известно, что генерация АФК клетками при стимуляции нейтрофилов запускается в результате активации НАДФН-оксидазы [10—12]. Электрон-транспортующий компонент оксидазы включает гетеродимерный флавоцитохром b_{558} . При стимуляции клетки четыре белковых компонента $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ и Rac-2, локализованных в цитоплазме, перемещаются к плазматической мембране и вместе с мембранным цитохромом формируют ферментативный комплекс. В неактивированных нейтрофилах большая часть цитохрома b_{558} (85 %) находится в мембранах специфических гранул. При активации клеток гранулы экзоцитируются и в плазматической мембране происходит сборка активной НАДФН-оксидазы [13—16]. Можно предположить, что увеличение выхода АФК на второй стадии связано не только со свободорадикальными

реакциями, катализируемыми МПО внутри клеток, но и с формированием дополнительных полиферментных комплексов в цитоплазматической мембране, включающих цитохром b_{558} из специфических гранул, а также с секрецией МПО из нейтрофилов.

Миелопероксидаза, секретируемая клетками в процессе адгезии, может взаимодействовать с МКЦ, что, вероятно, будет приводить к изменению активности этого фермента и механизмов образования АФК в реакциях с его участием. На рис. 2 показано влияние порошкообразных препаратов целлюлозы и МКЦ на интегральную интенсивность ЛЗХЛ нейтрофилов при фагоцитозе частиц латекса. Видно, что добавление МКЦ угнетает генерацию АФК нейтрофилами при поглощении частиц латекса, причем введение целлюлозы не влияет на выход АФК. Эффекты ингибирования, вызываемые МКЦ, в этом случае также зависят от содержания СООН-групп в полимере: с увеличением количества карбоксильных групп эффект ингибирования интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов при поглощении латекса усиливается. Показано, что при поглощении нейтрофилами частиц латекса образуются фагосомы, которые затем сливаются с цитоплазматическими гранулами, содержащими набор протеолитических ферментов и оксидоредуктаз [14, 17, 18]. Из литературы известно, что ряд полианионов тормозит слияние фагосом и гранул [19, 20]. Возможно, это и является причиной снижения интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов при стимуляции латексом в присутствии МКЦ.

Ранее установлено, что необходимым условием генерации АФК нейтрофилами при действии большинства стимуляторов является адгезия к субстрату [21]. Предположено, что одной из причин меньшего выхода ЛЗХЛ в присутствии МКЦ может быть изменение характера адгезионных взаимодействий клеток с производными целлюлозы [15, 16]. Для проверки этого предположения нами проведено сравнительное изучение степени адгезивности нейтрофилов к стеклу, прозрачным пленкам из целлюлозы и окисленной целлюлозы (количественные данные не приведены). Было выявлено, что степень адгезивности клеток к этим подложкам практически одинакова.

Чтобы исключить возможное влияние карбоксильных групп МКЦ на способность люминола испускать кванты света, нами изучена хемилюминесценция люминола при добавлении пероксида водорода в присутствии растворимых органических кислот: лимонной и полиметилметакриловой. Выявлено, что обе кислоты практически не влияют на ЛЗХЛ, индуцированную в реакции окисления лю-

минола пероксидом водорода. Скорее всего, МКЦ не оказывает действия на хемилюминесценцию люминола в этой модельной системе.

Ранее отмечено, что при активации нейтрофилов происходит выход миелопероксидазы из клеток во внеклеточную среду, в результате чего она может контактировать с МКЦ. Нами исследовано влияние порошкообразных образцов МКЦ с различным содержанием карбоксильных групп на активность МПО, выделенной из нейтрофилов (рис. 2). Видно, что с увеличением содержания COOH -групп интенсивность ЛЗХЛ в системе МПО— H_2O_2 —люминол резко снижается. Очевидно, что данный эффект обусловлен конформационными изменениями и последующим уменьшением активности фермента, так как МКЦ обладает значительной сорбционной способностью. Возможно, сорбция фермента осуществляется при участии карбоксильных групп МКЦ, поскольку увеличение их процентного содержания приводило к усилению ингибирующего эффекта, а введение в модельную систему МПО— H_2O_2 —люминол немодифицированной целлюлозы не вызвало изменений параметров ЛЗХЛ в исследуемой реакции. Аналогичные результаты характерны и для системы пероксидаза хрена (растительный аналог МПО)— H_2O_2 —люминол.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

— введение в суспензию нейтрофилов монокарбоксилцеллюлозы приводит к уменьшению выхода АФК на различных стадиях процесса активации клеток адгезией к стеклу и частицами латекса. Величины наблюдаемых эффектов не связаны с изменением степени адгезивности клеток к используемым субстратам из целлюлозы и МКЦ и зависят от концентрации карбоксильных групп в монокарбоксилцеллюлозе: повышение содержания COOH -групп от 0,26 до 16 % приводит к увеличению ингибирующего эффекта монокарбоксилцеллюлозы на индуцированное адгезией и латексом образование АФК в нейтрофилах.

— МКЦ при взаимодействии с миелопероксидазой снижает активность фермента, что приводит к уменьшению выхода АФК в реакции ферментативного окисления люминола пероксидом водорода.

A. A. Krjukov, G. N. Semenikova, V. E. Kaputcky,
S. N. Cherenkevich

Generation of reactive oxygen species by neutrophils under their interaction with monocarboxycellulose

Summary

An influence of monocarboxycellulose (MCC) with different content of COOH -groups on the oxygen activation systems of neutrophils isolated from blood of healthy donors has been studied using

luminol dependent chemiluminescence (LCDL) method. The addition of MCC into cell suspension leads to the decrease in reactive oxygen species (ROS) yield at different stages of cells activation by adhesion to glass surface and latex particles. This effect does not depend on adhesivity of cells to MCC films. However, it depends on the concentration of carboxy-groups in MCC: the increase of percentage of COOH -groups in MCC from 0.26 % to 16 % causes a decrease in the ROS yield in neutrophils. MCC also causes a decrease in the myeloperoxidase activity in a model system «MPO— H_2O_2 —luminol».

A. A. Крюков, Г. Н. Семенкова, В. Е. Капуцкий,
С. М. Черенкевич

Генерація активних форм кисню нейтрофілами при взаємодії з монокарбоксилцелюлозою з різним вмістом карбоксильних груп

Резюме

Методом люмінолзалежної хемілюмінесценції вивчено вплив монокарбоксилцелюлози (МКЦ) з різним вмістом карбоксильних груп на активуючі кисень системи нейтрофілів крові здорових людей. Додавання до суспензії клітин МКЦ спричинює зменшення виходу активних форм кисню (АФК) на різних стадіях процесу активації клітин адгезією до скла та частинками латексу. Отриманий ефект не залежить від ступеня адгезивності нейтрофілів до основи, виготовленої з МКЦ, та визначається лише концентрацією COOH -груп в МКЦ: зростання вмісту карбоксильних груп від 0,26 до 16 % призводить до зниження виходу АФК у нейтрофілах. МКЦ спричинює зменшення активності міелопероксидази (МПО) у модельній системі МПО— H_2O_2 —люмінол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев Ю. К., Капуцкий В. Е., Адарченко А. А., Собещук О. П. Механизм антибактериального действия монокарбоксилцеллюлозы и других ионообменных производных целлюлозы // Антибиотики и мед. биотехнология.— 1986.— № 8.— С. 624—627.
2. Абаев Ю. К., Капуцкий В. Е. Методологические аспекты характеристики сорбционных свойств перевязочных материалов // Материалы 1-го конгресса хирургов / Под ред. А. Н. Косинца.— Витебск, 1996.— С. 147—148.
3. Абаев Ю. К., Капуцкий В. Е., Адарченко А. А. Разработка и применение перевязочных средств пролонгированного антисептического действия // Материалы 1-го конгресса хирургов / Под ред. А. Н. Косинца.— Витебск, 1996.— С. 151—152.
4. Капуцкий В. Н., Юршинович Т. Л. Лекарственные препараты на основе целлюлозы.— Минск: Университетское, 1989.— 111 с.
5. Абаев Ю. К., Капуцкий В. Е. Коллоидно-химические подходы к оптимизации применения целлюлозных перевязочных материалов в современных условиях // Материалы 1-го конгресса хирургов / Под ред. А. Н. Косинца.— Витебск, 1996.— С. 153—154.
6. Smirnova E. N., Semenikova G. N., Kovalenko E. I., Gerein V., Cherenkevich S. N. Generation of active oxygen forms by neutrophils and granulocytopenia in patients with acute lymphoblastic leukemia under therapy with use of G-CSF Granulocyte // Acute Leukemias VII / Eds W. Hiddemann.— Berlin; Heidelberg: Springer, 1998.— P. 387—393.
7. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов // Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика.— М.: Медицина, 1980.— С. 9—36.
8. Semenikova G. N., Smirnova E. N., Kovalenko E. I., Gerein V., Cherenkevich S. N. Oxygen activating ability of neutrophils

- of children with non-Hodgkin's lymphomas at therapy with G-CSF // *Exp. Oncol.*—1997.—N 2.—P. 153—156.
9. *Albrecht D., Jungi T. W.* Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood — derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes // *J. Leukoc. Biol.*—1993.—54, N 4.—P. 300—306.
10. *Клюбин И. В., Гамалей И. А.* НАДФН-оксидаза — специализированный комплекс для образования активных метаболитов кислорода // *Цитология.*—1997.—39, № 4/5.—С. 320—340.
11. *Семенкова Г. Н.* Генерация активных форм кислорода при стимуляции лимфоцитов и нейтрофилов крови человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Минск, 1989.—21 с.
12. *Тимошенко А. В., Черенкевич С. Н.* Гликобиологические аспекты активации дыхательной цепи фагоцитов // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 1.—С. 58—66.
13. *Babior B. M.* NADPH-oxidase: an update // *Blood.*—1999.—93, N 5.—P. 1464—1476.
14. *Глебов Р. Н.* Эндоцитоз и экзоцитоз.—М.: Высш. школа, 1987.—95 с.
15. *Richard A. W., Michio N., Kenneth R.* Priming of neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome b₅₅₈-containing granules // *J. Biol. Chem.*—2000.—275, N 47.—P. 36713—36719.
16. *DeLeo R. F., Renee J., McCornick S., Nakamuro M., Apicella M., Weiss J. P.* Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase activity // *J. Clin. Invest.*—1998.—101, N 2.—P. 455—463.
17. *Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C.* Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing // *Blood.*—1998.—92, N 9.—P. 3007—3017.
18. *Белова Л. А.* Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов // *Биохимия.*—1997.—62, № 6.—С. 659—668.
19. *Vered M., Simon S.* Inhibition of human neutrophils elastase by bacterial polyanions // *Exp. Lung Res.*—1998.—14, № 1.—P. 67—83.
20. *James E. S., Thomas K. P.* L-selectin signaling of neutrophils adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.*—1997.—275, N 21.—P. 15876—15884.
21. *Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н.* Активные формы кислорода и функциональный отклик иммунных клеток // *Фотобиология и мембранная биофизика* / Под. ред. И. Д. Волоотовского.—Минск, 1999.—С. 209—220.

УДК 612.112.3:615.468.28
Надійшла до редакції 15.04.02