

УДК 616.155.11/.34-06:616.36-003.826+616.24-018.2]-092.9

©Д. В. Козак, Н. В. Волотовська, О. М. Креховська

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

ВПЛИВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ, ЕНДОТОКСИНІВ ТА ІМУННИХ РЕАКЦІЙ НА АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛІВ І МАКРОФАГІВ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ТА ЛЕГЕНЬ У ЗДОРОВИХ БІЛИХ ЩУРІВ

ВПЛИВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ, ЕНДОТОКСИНІВ ТА ІМУННИХ РЕАКЦІЙ НА АПОПТОЗ НЕЙТРОФІЛІВ І МАКРОФАГІВ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ ТА ЛЕГЕНЬ У ЗДОРОВИХ БІЛИХ ЩУРІВ – Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу легневих і печінкових нейтрофілів та макрофагів у статевозрілих нелінійних щурів-самців. Показано, що інтенсивність цього процесу залежить від вмісту у крові ендотоксинів, продуктів перекисного окиснення ліпідів, маркера запалення церулоплазміну, циркулюючих імунних комплексів. Виявлено особливості перебігу апоптозу нейтрофілів і макрофагів у легнях та печінці.

ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, ЭНДОТОКСИНОВ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ НА АПОПТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ И МАКРОФАГОВ ТКАНИ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ У ЗДОРОВЫХ БЕЛЫХ КРЫС – Установлено физиологические пределы раннего апоптоза легочных и печеночных нейтрофилов и макрофагов у половозрелых неллинейных крыс-самцов. Показано, что интенсивность этого процесса зависит от содержания в крови эндотоксинов, продуктов перекисного окисления липидов, маркера воспаления церулоплазмينا, циркулирующих иммунных комплексов. Выявлены особенности протекания апоптоза нейтрофилов и макрофагов в легких и печени.

IMPACT OF FREE RADICAL PROCESSES, ENDOTOXIN AND IMMUNE REACTIONS ON THE APOPTOSIS OF NEUTROPHILS AND MACROPHAGES OF LIVER TISSUES AND LUNGS OF HEALTHY WHITE RATS – The physiological ranges of early apoptosis of pulmonary and hepatic neutrophils and macrophages were established in nonlinear mature male rats. It was shown that the intensity of this process depends on the content of the blood endotoxins, lipid peroxidation products, inflammatory marker ceruloplasmin, circulating immune complexes. It was determined the peculiarities of apoptosis flow in the lungs and liver neutrophils and macrophages.

Ключові слова: апоптоз, нейтрофіли легень, макрофаги печінки.

Ключевые слова: апоптоз, нейтрофилы легких, макрофаги печени.

Key words: apoptosis, neutrophils in the lungs, macrophages in the liver.

ВСТУП При багатьох патологічних процесах у тканинах паренхіматозних органів стимулюється апоптоз, який належить до ключових патогенетичних механізмів розвитку поліорганно недостатності [2]. У фізіологічних умовах апоптоз забезпечує збереження тканинного гомеостазу, сприяючи загибелі неповноцінних клітин без розвитку явищ запалення [8]. Його рівень у здоровому організмі вивчено недостатньо. Немає даних про апоптоз нейтрофілів і макрофагів тканини печінки та легень, а також їх взаємозв'язок із інтенсивністю перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантного захисту, вмістом ендотоксинів та інтенсивністю імунних реакцій, які в умовах патології є одними з ключових чинників його стимуляції [9, 12].

Метою роботи стало з'ясування рівня апоптозу нейтрофілів і макрофагів тканини печінки та легень у здорових білих щурів та його взаємозв'язок із показниками ПОЛ, антиоксидантного захисту, вмістом ендотоксинів на циркулюючих імунних комплексах.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Експерименти проведено на 20 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–

200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин анестезували внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 90 мг/кг маси тварини. Виділення нейтрофілів та макрофагів з цільно венозної крові проводили методом градієнтного центрифугування. Для виділення нейтрофілів та макрофагів органів, промиті в фосфатно-сольовому буфері легень та печінку гомогенізували в подрібнювачі тканин, гомогенат центрифугували 20 хв при 8000 об/хв. З надосадово рідини виділяли фракції лейкоцитів на градієнті щільності фікол-тріумбасту за вищевказаними методами. Для оцінки реалізації апоптозу монукулеарних лейкоцитів та нейтрофілів легень та печінки використовували ФІТЦ-мічений анексин V з набору реагентів “ANNEXIN V FITC” (“Beckman Coulter”, Франція). Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL (“Beckman Coulter”, Франція).

Стан ПОЛ оцінювали за вмістом у гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів ПОЛ [1]. Рівень антиоксидантно системи визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [5] і каталази [7] та вмістом SH-груп і церулоплазміну (ЦП) у сироватці крові [6]. Рівень ендогенно інтоксикації визначали за вмістом молекул середньої маси (МСМ) [3], еритроцитарного індексу інтоксикації [10]. Стан імунологічно резистентності встановлювали за рівнем циркулюючих імунних комплексів [11]

Отримані цифрові дані аналізували методом варіаційно статистики з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з таблиці 1, у здорових статевозрілих щурів-самців ранній апоптоз нейтрофілів у легнях знаходився в межах від 0,46 до 0,58 % ($p < 0,05$), у печінці – від 0,17 до 0,29 % ($p < 0,05$). При цьому ступінь раннього апоптозу нейтрофілів у легнях був статистично достовірно більшим, ніж у печінці ($p < 0,001$).

Ранній апоптоз макрофагів у легнях становив від 0,27 до 0,47 % ($p < 0,05$), у печінці – від 0,56 до 0,76 % ($p < 0,05$). Слід відмітити, що ранній апоптоз макрофагів у печінці виявився істотно більшим, ніж у легнях ($p < 0,001$).

Кореляційний аналіз ступеня раннього апоптозу нейтрофілів легень із досліджуваними біохімічними та імунологічними показниками показав (табл. 2) наявність позитивних кореляцій середньої сили із вмістом у сироватці крові ТБК-активних продуктів ПОЛ, SH-груп, церулоплазміну, МСМ, ЕІІ та негативних сильних із активністю в сироватці крові СОД та каталази. У свою чергу ранній апоптоз макрофагів легень позитивно корелював із вмістом у сироватці крові SH-груп (сильний зв'язок), ЕІІ та вмістом ЦІК у сироватці крові (зв'язки середньої сили), також негативно – із вмістом у сироватці крові церулоплазміну (зв'язок середньої сили).

Таблиця 1. Ступінь апоптозозмінених нейтрофілів і макрофагів печінки і легень у нормі (M±m)

Орган	Апоптоз ранній, % (n=20)	Апоптоз пізній, % (n=20)	Неуражені клітини, % (n=20)
Нейтрофіли			
Легені	0,50±0,02	0,58±0,07	97,57±0,15
Печінка	0,23±0,03 ^{###}	0,84±0,08 [#]	98,70±0,19
Макрофаги			
Легені	0,37±0,05	0,44±0,06	99,17±0,07
Печінка	0,66±0,05 ^{###}	0,61±0,05 [#]	98,72±0,09 ^{###}

Примітка. # – достовірність відмінностей показників у печінці порівняно із легенями – (# – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001).

Таблиця 2. Кореляції ступеня раннього апоптозу нейтрофілів і макрофагів печінки й легень з показниками перекисного окиснення, антиоксидантного захисту, ендогенно інтоксикації та імунологічно резистентності в нормі

Показники	Легені		Печінка	
	нейтрофіли	макрофаги	нейтрофіли	макрофаги
ТБК-активні продукти ПОЛ	0,46 [*]	-0,35	0,68 ^{**}	0,89 ^{**}
СОД	-0,86 ^{**}	-0,18	-0,85 ^{**}	-0,41
Каталаза	-0,81 ^{**}	-0,17	-0,87 ^{**}	-0,65 ^{**}
SH-групи	0,58 ^{**}	0,89 ^{**}	0,26	0,41
Церулоплазмін	0,52 ^{**}	-0,46 [*]	0,81 ^{**}	0,42
MCM	0,65 ^{**}	-0,11	0,76 ^{**}	0,78 ^{**}
EII	0,47 [*]	0,44 [*]	0,29	-0,32
ЦІК	-0,03	0,50 [*]	-0,25	0,38

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

У печінці ступінь раннього апоптозу нейтрофілів позитивно сильно корелював із вмістом у сироватці крові церулоплазмину та MCM, середньо сили зв'язок виявлено із вмістом у сироватці крові ТБК-активних продуктів ПОЛ. Крім цього, виявлено сильні негативні кореляційні зв'язки із активністю СОД та каталази у сироватці крові. Ступінь раннього апоптозу макрофагів печінки позитивно сильно корелював із вмістом у сироватці крові ТБК-активних продуктів ПОЛ і MCM та негативно середньо сили із активністю у сироватці крові каталази.

Одержані результати свідчать про те, що у легенях більш притаманний ранній апоптоз нейтрофілів, в той час, як у печінці – макрофагів. Можна припустити, що відповідно у легенях нейтрофіли, а в печінці макрофаги відіграють ключову роль у підтриманні локального імунітету і більшою мірою контактують із речовинами антигенно природи, які здатні стимулювати в них апоптоз.

Аналіз кореляцій показав, що ступінь раннього апоптозу нейтрофілів як у легенях, так і в печінці збільшується із зростанням у крові вмісту продуктів ПОЛ, ендотоксинів та зниженням активності ферментативно ланки антиоксидантного захисту, що відповідає сучасному баченню основних механізмів стимулювання апоптозу в патологічних умовах [9, 12]. Головною відмінністю кореляцій раннього апоптозу нейтрофілів легень і нейтрофілів печінки є позитивний зв'язок із вмістом у крові вільних SH-груп, що також було характерним і для легеневих макрофагів. Відомо, що SH-групи білкових молекул, в основному відновленого глутатіону одними з перших беруть участь у нейтралі-

зації вільних радикалів та токсинів [4]. Цей процес відбувається безперервно, що супроводжується посиленням утворенням відновленого глутатіону, який, очевидно, у фізіологічних умовах пропорційний до накопичення ендотоксинів та вільних радикалів, й тому позитивно корелює із ступенем первинного апоптозу.

Що стосується кореляцій ступеня первинного апоптозу макрофагів, то він у легенях зростає із збільшенням EII та ЦІК у сироватці крові й зменшується при зростанні вмісту церулоплазмину сироватки крові. У печінці даний показник із збільшенням вмісту в крові MCM та зменшується із зростанням активності каталази сироватки крові. Ці відмінності, ймовірно, зумовлені функціональними особливостями макрофагів тканини печінки та легень. У печінці вони беруть активну участь у нейтралізації ендотоксинів і піддаються впливу активних форм кисню, які самі ж утворюють у процесі фагоцитозу [4]. У легенях нейтрофіли найшвидше реагують на зміну оксидантно-антиоксидантного гомеостазу, зумовлюючи накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та поглиблюючи оксидативний стрес. Внаслідок посилення оксидативного стресу альвеолярні макрофаги спонтанно виділяють підвищену кількість H₂O₂, що зумовлює прогресування процесів вільнорадикального окиснення [13].

ВИСНОВКИ 1. Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу легеневих і печінкових нейтрофілів та макрофагів у статевозрілих нелінійних шурів-самців, які можна використовувати в умовах вивчення механізмів різноманітних патологічних

процесів та встановлення ефективності корегувальних програм.

2. Посилення раннього апоптозу нейтрофілів тканини легень і печінки пов'язане із збільшенням у крові ендотоксинів, продуктів ПОЛ, маркера запальної реакції – церулоплазміну. Зменшення цього процесу настає із зростанням активності ферментативно ланки антиоксидантного захисту.

3. Ранній апоптоз макрофагів легень і печінки зумовлений їх функціональним призначенням й у печінці зростає із збільшенням активності ПОЛ, накопиченням ендотоксинів і зменшується із збільшенням активності каталази. У легенях він зростає на тлі підвищення вмісту в сироватці крові вільних SH-груп, порушення функціонального стану мембран еритроцитів та накопичення циркулюючих імунних комплексів і зменшується при зростанні вмісту в крові церулоплазміну.

У **перспективі** стан раннього апоптозу тканинних нейтрофілів та макрофагів буде досліджуватися в умовах політравми та 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. Белушкина Н. Н. Роль апоптоза в патогенезе заболеваний / Н. Н. Белушкина // Мой врачебный журнал. – 2002. – Т. 14, № 7. – С. 15–23.
3. Волчегорский И. А. “Средние молекулы” как вероятные регуляторы системы эритрона у спортсменов-лыжников / И. А. Волчегорский, Д. А. Дятлов, Е. И. Львовская и др. // Физиология человека. – 1996. – Т. 22, № 3. – С. 136–137.
4. Гончарук Є. Г. Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючо ді шкідливих чинників довкілля / Є. Г. Гончарук, М. М. Коршун // Журнал академії медичних наук України. — 2004. — Т. 10, № 1. — С. 131–150.
5. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2000. – 280 с.
6. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
7. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
8. Лушников Е. Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е. Ф. Лушников, А. Ю. Абросимов – М. : Медицина. – 2001. – 190 с.
9. Скулачев В. П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В. П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 2001. – Т. 7, № 6. – С. 4–11.
10. Тогайбаев А. А. Способ диагностики эндогенной интоксикации / А. А. Тогайбаев, А. В. Кургузкин, Р. М. Рикун, Р. М. Крибжанова // Лаб. дело. – 1988. – Т. 4, № 9. – С. 22–24.
11. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические методы исследования в клинике / Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова. – К. : Здоров'я, 1978. – 159 с.
12. Kam P. C. Apoptosis: mechanisms and clinical implications / P. C. Kam, N. I. Ferch // Anaesthesia. – 2000. – Vol. 55. – P. 1081–1093.
13. Kantari C. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity / C. Kantari, M. Pederzoli-Ribeil, V. Witko-Sarsat // Contrib. Microbiol. – 2008. – Vol. 15. – P. 118–146.

Отримано 24.03.11