

ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ НЕЙТРОФИЛАМИ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА

*Е.И. Коваленко, Т.З.Л. Нгуен, А.А. Кашкевич
Минск, БГУ*

Нарушение окислительно-восстановительного баланса, как и баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов наблюдается при развитии атеросклероза коронарных артерий и ишемической болезни сердца (ИБС). Провоспалительные цитокины ИЛ-1 β , ИЛ-6 индуцируют гиперактивацию фагоцитов, которые активно мигрируют к местам повреждения стенки сосуда, накапливаются в атеросклеротических бляшках, секретируют гидролитические и редокс-ферменты, в частности, миелопероксидазу (МПО), генерируют активные формы кислорода и азота (АФКА) [1]. Секретируемые клетками вещества приводят к усилению повреждения эндотелия и способности бляшки к распаду, при этом степень риска неблагоприятных событий при ИБС значительно возрастает [1]. Секретируемые фагоцитами вещества могут вызывать повреждение различных клеток крови, в том числе эритроцитов, дефекты которых выявляются при ИБС. Ишемия, обусловленная ухудшением циркуляции крови из-за сужения сосудов, может еще более усугубляться вследствие нарушения газотранспортной функции эритроцитов. Функционирование эритроцитов ключевым образом связано с их способностью деформироваться: нарушение формы эритроцитов, снижение эластичности мембран, изменение отношения площади поверхности клетки к объему и удельного содержания гемоглобина приводит к ухудшению газотранспортной функции эритроцитов и ускоренному гемолизу [2, 3]. Повреждение структур организма при действии АФКА отражает развитие окислительного и нитрозативного стресса при ИБС. С целью выявления взаимосвязи изменения свойств эритроцитов с гиперактивацией фагоцитов крови в работе изучено влияние нейтрофилов на структурно-функциональные свойства эритроцитов, определена роль NO и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) во взаимодействии этих клеток.

Материал и методы. Изолированные нейтрофилы и эритроциты крови суспензировали в среде Эрла и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C в присутствии стимуляторов активности нейтрофилов fMLP и форбол-миристан-ацетата. Структурные параметры эритроцитов изучали методом малоуглового светорассеяния [4] с использованием лазерного нефелометра. Клетки фиксировали, окрашивали и делали снимки с помощью светового микроскопа и цифровой камеры. Кинетики гемолиза эритроцитов изучали с помощью четырехканального нефелометра (БГУ, Беларусь), регистрируя изменение оптической плотности во времени $D(t)$. Тип гемоглобина в эритроцитах определяли по электронным спектрам поглощения, проводя измерения в диапазоне 340–700 нм с помощью спектрофотометра PV 1251 (“Солар”, Беларусь) и системы n-Vision (“Новые аналитические системы”, Беларусь).

Результаты и обсуждение. Свежевыделенные эритроциты характеризуются размерами 2,5 и 7,0 мкм, что согласуется с представлениями о дисковидной форме эритроцитов с диаметром около 7 мкм и высотой около 2–2,5 мкм. После инкубирования эритроцитов при 37°C в течение 24 ч наблюдается снижение числа клеток с размерами 7 мкм и рост числа клеток с размерами 4,5–5,5 мкм. При микроскопии популяция эритроцитов выглядит разнородной, клетки различаются по диаметру в 1,5–2 раза (рис. 1, а). После инкубирования эритроцитов в присутствии активированных нейтрофилов выявляется изменение структуры эритроцитов: суспензия становится более однородной с диаметром клеток 3–4 мкм, на микроскопии клетки выглядят более плотными (см. рис. 1, б). Изменение структуры эритроцитов, индуцируемое нейтрофилами, предотвращается в случае добавления в среду инкубирования перехватчика NO, ингибиторов индуцибельной NO-синтазы (iNOS), ингибитора сборки микрофиламентов цитохалазина В, ингибитора циклооксигеназы (COX). Полученные данные свидетельствуют о том, что под действием стимуляторов активности в нейтрофилах происходит активация элементов цитоскелета, сборка систем генерации АФКА, активация iNOS, COX, дегрануляция и высвобождение МПО. Нейтрофилы подвергаются гибели, а АФКА, ферменты гранул и другие компоненты клеток оказываются во внеклеточной среде и вызывают изменения в эритроцитах.

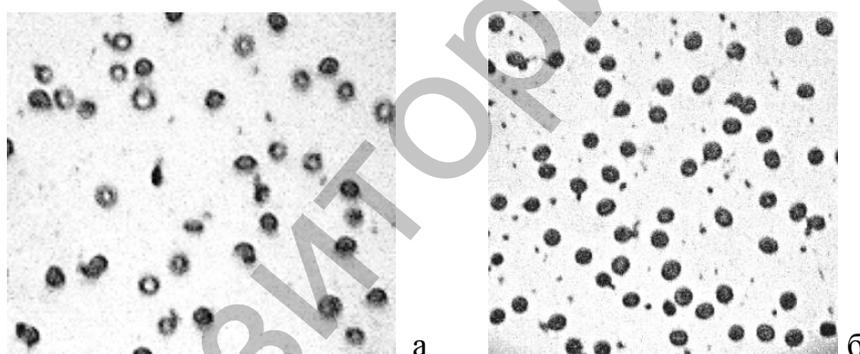


Рис.1. Фотографии эритроцитов, инкубированных в отсутствие (а) или присутствии нейтрофилов (б), активированных действием fMLP

Форма эритроцитов зависит от состояния их плазматических мембран и подмембранного цитоскелета, тогда как модификация этих структур может сопровождаться изменением скорости гемолиза [2]. Выявлено, что у эритроцитов, подвергнутых воздействию фагоцитов, наблюдается уменьшение крутизны гемолитической кривой $D(t)$ и увеличение времени гемолиза. Длительность кислотного гемолиза у эритроцитов, инкубированных в присутствии активированных нейтрофилов, составляет $(6,9 \pm 0,1)$ мин, а у инкубированных без фагоцитов – $(6,2 \pm 0,1)$ мин. По-видимому, продукты активированных нейтрофилов приводят к структурным изменениям мембран эритроцитов, замедлению кооперативных процессов, обеспечивающих клеточную деформацию и уменьшению способности клеток к изменению формы. Аналогичные изменения наблюдались при воздействии на эритроциты экзогенного ONOO^- [5].

Анализ спектров поглощения супернатантов разрушенных эритроцитов, инкубированных в отсутствие или присутствии нейтрофилов, позволил устано-

вить, что в результате воздействия активированных нейтрофилов в эритроцитах происходит преобразование оксигемоглобина в метгемоглобин.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что активированные нейтрофилы приводят к изменению структурно-функциональных характеристик эритроцитов, включая нарушение морфологии клеток, изменение гемолитической устойчивости, образование метгемоглобина в эритроцитах. Результаты работы подтверждают, что в условиях воспаления и развития окислительного и нитрозативного стресса нейтрофилы могут вызывать ухудшение деформационных свойств эритроцитов и снижение способности эритроцитов снабжать ткани кислородом.

Список литературы

1. Изменение показателей фагоцитарного и гуморального иммунитета у больных со стенокардией напряжения функционального класса III при прогрессировании заболевания / Коваленко Е.И. и др. // Новости медико-биологических наук. 2011. Т. 3, № 1, С. 45-51.
2. Новицкий В.В., и др. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во ТГУ, 2004. 202 с.
3. Зарубина Е.Г. Структурно-функциональные эритроцитарные нарушения у больных инфарктом миокарда и их коррекция : Автореф. дис. д. мед. наук. М. 2003. 21 с.
4. Experimental and theoretical study of light scattering by individual mature red blood cells by use of scanning flow cytometry and a discrete dipole approximation / M. Yurkin, et al. // Appl. Opt. 2005. V.44. P.5249–5256
5. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови, 2011. 200 с.