

УДК 612.112.9.91

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА СТЕПЕНЬ АКТИВНОСТИ НАДФН-ОКСИДАЗЫ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Полежаева Т.В., <sup>1</sup>Зайцева О.О., <sup>1</sup>Худяков А.Н., <sup>1</sup>Соломина О.Н.,  
<sup>2</sup>Патурова И.Г., <sup>3</sup>Утемов С.В.

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт физиологии» Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, e-mail: ddc@yandex.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Киров;

<sup>3</sup>ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови» ФМБА России, Киров

С помощью хемиллюминесцентного метода изучено влияние адреналина ( $10^{-6}$  г/л), инсулина ( $10^{-8}$  г/л), гистамина ( $10^{-4}$  моль/л), прогестерона ( $5 \cdot 10^{-5}$  г/л), эстрогена ( $10^{-5}$  г/л), иммуноглобулина G (5 г/л), а также температурных воздействий (+45°C, +2°C, -2°C) на степень активации НАДФН-оксидазы мембран нейтрофилов периферической крови человека. Показано, что иммуноглобулин G (5 г/л) и инсулин ( $10^{-8}$  г/л) вызывают повышенную радикальную реакцию у нейтрофилов на гистамин ( $10^{-4}$  моль/л), а охлаждение крови небеременных женщин до -2°C – на прогестерон ( $5 \cdot 10^{-5}$  г/л). Возможность температурной модуляции активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов через рецепторы к веществам может стать новым путем управления механизмами иммунитета в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, НАДФН-оксидаза, адреналин, инсулин, гистамин, прогестерон, эстроген, иммуноглобулин G, охлаждение до -2°C, экспозиция при +45°C, экспозиция при +2°C, окислительная активность

## INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS ON THE DEGREE OF ACTIVITY OF NADPH OXIDASE IN HUMAN BLOOD NEUTROPHILS

<sup>1</sup>Polezhaeva T.V., <sup>1</sup>Zaytseva O.O., <sup>1</sup>Khudyakov A.N., <sup>1</sup>Solomina O.N.,  
<sup>2</sup>Paturova I.G., <sup>3</sup>Utemov S.V.

<sup>1</sup>Physiology Institute of the Komi Scientific Center affiliated to the Ural Branch  
of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, e-mail: ddc@yandex.ru;

<sup>2</sup>Kirov State Medical Academy, Kirov;

<sup>3</sup>Kirov Research Institute of Haematology and Blood Transfusion, Kirov

The effect of epinephrine ( $10^{-6}$  g/l), insulin ( $10^{-8}$  g/l), histamine ( $10^{-4}$  mol/l), progesterone ( $5 \cdot 10^{-5}$  g/l), estrogen ( $10^{-5}$  g/l), immunoglobulin G (5 g/l), and the effects of temperature (+45°C, +2°C, -2°C) on the degree of activation of NADPH oxidase membrane of neutrophils in peripheral blood of human has been studied using a method of chemiluminescence. It has been shown that immunoglobulin G (5 g/l) and insulin ( $10^{-8}$  g/l) increase the neutrophil oxidative activity. Hyperthermic impact (30 min at +45 °C) causes increased radical reaction to histamine ( $10^{-4}$  mol/l) in neutrophils. Progesterone ( $5 \cdot 10^{-5}$  g/l) causes a similar reaction after cooling blood (-2°C) of non-pregnant women. The possibility of temperature modulation of NADPH oxidase activity of neutrophils through the receptors for the substances may become the new way for control mechanism of immunity *in vitro*.

**Keywords:** neutrophils, NADPH-oxidase, adrenaline, insulin, histamine, progesterone, estrogen, immunoglobulin G, cooling to -2°C, exposure at +45°C, exposure at +2°C, oxidation activity

При активации многокомпонентного энзима плазматических мембран нейтрофилов и мембран секреторных гранул – НАДФН-оксидазы в клетках повышается содержание пероксида водорода, который, в свою очередь, инактивирует тирозин-фосфатазы и активирует тирозин-киназы, регулируя тем самым степень фосфорилирования многих клеточных ферментов и, следовательно, их активность [12]. В условиях нормы энзиматическая активность НАДФН-оксидазы ограничена в пространстве фагосомой и во времени аутодеактивацией [6]. Принято говорить о двух механизмах ее регуляции: о разделении мембранных и цитозольных субъединиц в покоящейся клетке и модифи-

кации белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. При стимуляции фагоцита фактором корпускулярной или растворимой природы, действующим через рецепторы или по рецептор-независимому механизму, происходит быстрая самосборка энзима. Снижение активности НАДФН-оксидазы наблюдается при ряде врожденных и наследственных заболеваний, при термических ожогах и обморожениях, при лучевой терапии, при опухолевых заболеваниях, у новорожденных недоношенных детей и др. [1]. Актуальным является изучение механизмов регуляции НАДФН-оксидазы и поиск стимуляторов активности указанного энзима [7].

**Целью данной работы** явилось изучение влияния факторов различной природы на степень активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов периферической крови человека.

### Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали лейкоциты крови человека, полученные из крови доноров-добровольцев ( $39 \pm 10$  лет) путем цитафереза (2500 об/мин с охлаждением 5 минут, Sorvall, США) с их информированного согласия. Количество лейкоцитного концентрата в среднем составляло  $21,0 \pm 2,0$  мл. Данная трансфузионная среда с высоким содержанием лейкоцитов (27 000 – 32 000 в 1 мкл) имела незначительную примесь эритроцитов, тромбоцитов, стволовых клеток и плазмы.

В работе использованы следующие вещества: адреналин («Эпинефрин», ФГУП «Московский эндокринный завод») в концентрации  $10^{-6}$  г/л; инсулин растворимый человеческий генно-инженерный (препарат инсулина короткого действия «Актрапид НМ», Ново Нордиск А/С, Дания) в концентрации  $10^{-8}$  г/л; эстроген («Прогинова», Байер Шеринг Фарма АГ, Германия) в концентрации  $10^{-5}$  г/л; прогестерон («Дюфастон», Эбботт Биолоджикалз Б.В., Нидерланды) в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  г/л; гистамин (Дигидрохлорид гистамина, Сигма) в концентрации  $10^{-4}$  моль/л; иммуноглобулин G («Иммуновенин», НПО «Микроген», Уфа) в концентрации 5 г/л. Для приготовления растворов указанных выше веществ использован раствор Хенкса стерильный (ООО «БиолоТ», СПб). При выборе концентраций ориентировались на опубликованные данные [4, 5, 9–11]. Исследования выполнены в осенне-зимний период. В пробах с половыми гормонами использовалась кровь небеременных женщин-доноров (лютеиновая фаза) репродуктивного возраста.

Степень активности НАДФН-оксидазы клеток оценивали с помощью метода индуцированной (перекисью водорода с сульфатом железа) хемилюминесценции на биохемилюминиметре БХЛ-07 (ЦИНЛ НГМА; «ИМБИО», Нижний Новгород). В связи с тем, что среди клеток крови основным продуцентом активных форм кислорода, обладающих бактерицидным действием, являются нейтрофилы, при оценке хемилюминесценции венозной или капиллярной крови интенсивностью свечения моноцитов и лимфоцитов пренебрегали [8].

В измерительную кювету прибора вносили 0,1 мл лейкоцитного концентрата с одним из вышеуказанных препаратов в соответствующей концентрации и 0,4 мл фосфатного буфера (рН = 7,5), добавляли 0,4 мл 0,01 мМ раствора сульфата железа (ОАО «Спектр-Хим» г. Москва) и помещали в измерительную кювету. После чего в нее быстро вносили 0,2 мл 2% раствора перекиси водорода (ЗАО «СП Химпром», г. Самара) и регистрировали сигнал в течение 30 с. Оценивали следующие параметры:  $I_{\max}$  (мВ) – максимальную интенсивность быстрой вспышки, отражающей потенциальную способность биологического объекта к свободно радикальному окислению;  $S$  (мВ·с) – светосумму за 30 с, отражающую содержание радикалов  $RO_2$ ;  $tg(-2\alpha)$  – тангенс угла наклона кривой оси времени (характеризует максимальную крутизну спада кривой, со знаком «–»), чем выше значение показателя  $tg(-2\alpha)$ , тем выше активность ферментативных систем клеток, регулирующих содержание гидрперекисей.

В качестве температурного воздействия использовали следующие температуры:  $+45^\circ\text{C}$ ,  $+2^\circ\text{C}$  и  $-2^\circ\text{C}$ . В опытах с температурами  $+45^\circ\text{C}$  и  $+2^\circ\text{C}$  лейкоцитный концентрат разливали по 2 мл в микропробирки и выдерживали при указанных температурах в течение 30 мин, используя для этих целей соответственно термостат для микропробирок «Гном» и бытовой электрический холодильник «Саратов-1615М».

В опытах с температурой  $-2^\circ\text{C}$  лейкоцитный концентрат в пластиковой пробирке в объеме 5 мл помещали в электрический морозильник «Derby» (Дания) на  $-20^\circ\text{C}$ . С помощью цифрового дистантного термометра «Checktemp 1» (Румыния) контролировали температуру охлаждаемой клеточной взвеси. Средняя скорость снижения температуры составляла  $2,3^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Отмечалось плавное снижение температуры без выброса кристаллизационного тепла с сохранением вязкого состояния биообъекта. Общее время охлаждения составляло 9–10 мин. Сохранность клеток, подвергнутых охлаждению до  $-2^\circ\text{C}$ , оценивали с помощью метода световой микроскопии (Nikon H550S, Япония) в пробах с 1,0% раствором суправитального красителя эозина, считая признаком повреждения клеточной мембраны диффузное окрашивание цитоплазмы в розовый цвет. Необходимо отметить, что данное температурное охлаждение во всех случаях не вызывало статистически значимой гибели клеток.

При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение  $\pm$  среднее квадратичное отклонение ( $M \pm \delta$ ). Для выявления статистической значимости различий ( $p < 0,05$ ) между группами применяли непараметрический критерий Вилкоксона [3] с использованием компьютерной программы для медико-биологической статистики «BIOSTAT».

### Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования оценивалось влияние различных веществ и температур на способность нейтрофилов продуцировать кислородные метаболиты и, в частности, перекись водорода. Подтверждено, что при воздействии иммуноглобулина G в концентрации 5 г/л и инсулина в концентрации  $10^{-8}$  г/л (уровень в крови при генерализованных воспалительных процессах) отмечается статистически значимый рост показателей активности нейтрофилов (таблица). В отношении остальных исследуемых факторов изменений активности клеток не выявлено. Вероятно, выявить описанные в литературе эффекты нам не удалось по ряду причин: использование аналогов веществ в близких концентрациях, влияние сезона года или иное.

На следующем этапе исследования изучено влияние температурного воздействия ( $+45^\circ\text{C}$ ,  $+2^\circ\text{C}$  и  $-2^\circ\text{C}$ ) на эффекты используемых в работе веществ (рисунок). Установлено, что экспозиция лейкоцитов 30 минут при  $+2^\circ\text{C}$  или их охлаждение до  $-2^\circ\text{C}$  не изменяют чувствительность рецепторов нейтрофилов к инсулину, адреналину, гистамину и эстрогену (у небеременных женщин). Охлаждение крови небеременных женщин

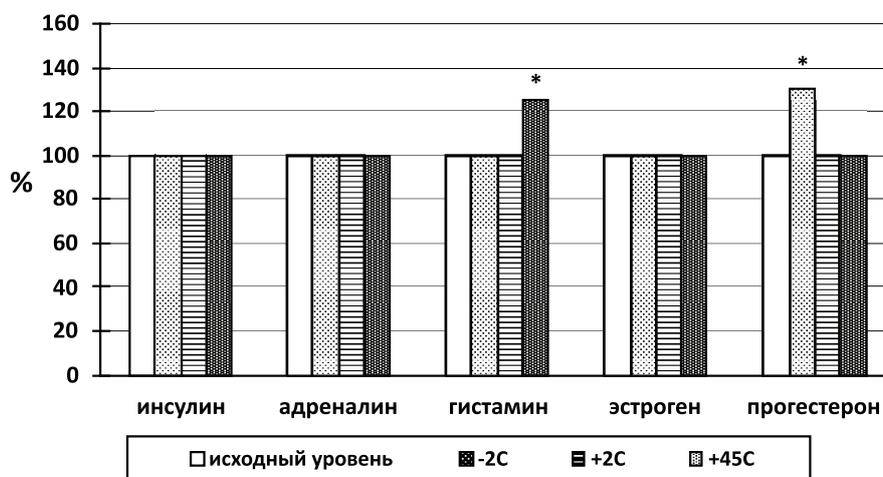
до  $-2^{\circ}\text{C}$  повышает чувствительность нейтрофилов к прогестерону и не изменяет ее к эстрогену. Известно, что прогестерон в концентрации 20–100 нг/мл, что соответствует концентрации I и III триместра беременности, вызывает угнетение окислительной активности нейтрофилов [4], нами выявлена способность прогестерона

(50 нг/мл) стимулировать НАДФН-оксидазу нейтрофилов только их после кратковременного охлаждения до  $-2^{\circ}\text{C}$ , т.е. до начала кристаллизации воды. Вероятно, снижение гидрофобных взаимодействий структурных компонентов мембран и их перестройка при охлаждении [2] влияют на изменение количества рецепторов к прогестерону.

Влияние факторов различной природы на активность НАДФН-оксидазы нейтрофилов периферической крови практически здоровых доноров-добровольцев по показателям хемиллюминограмм

Серия	n	Показатели хемиллюминограммы		
		$I_{\max}$ (мВ)	S (мВ·с)	$\text{tg}(-2\alpha)$
Нейтрофилы	12	$290 \pm 38,2$	$1576 \pm 176,4$	$77,8 \pm 15,9$
+ иммуноглобулин		$433 \pm 40,4 *$	$2283 \pm 303,5 *$	$158,1 \pm 20,0 *$
Нейтрофилы	15	$285 \pm 59,9$	$1678 \pm 283,9$	$82,7 \pm 8,7$
+ гистамин		$273 \pm 56,9$	$1562 \pm 205,2$	$81,4 \pm 7,1$
Нейтрофилы НБЖ	15	$205 \pm 15,8$	$1335 \pm 185,8$	$48,2 \pm 7,4$
+ прогестерон		$219 \pm 23,3$	$1385 \pm 218,9$	$55,0 \pm 9,9$
Нейтрофилы НБЖ	15	$205 \pm 15,8$	$1335 \pm 185,8$	$48,2 \pm 7,4$
+ эстроген		$223 \pm 29,2$	$1274 \pm 90,4$	$54,4 \pm 11,8$
Нейтрофилы	10	$166 \pm 18,1$	$1048 \pm 32,8$	$37,5 \pm 7,9$
+ инсулин		$193 \pm 18,7*$	$1172 \pm 72,8*$	$44,3 \pm 7,3$
Нейтрофилы	10	$218 \pm 47,0$	$1312 \pm 199,9$	$49,5 \pm 12,5$
+ адреналин		$234 \pm 14,7$	$1439 \pm 139,1$	$56,6 \pm 8,9$
Нейтрофилы	12	$178 \pm 22,4$	$1104 \pm 220,0$	$46,9 \pm 4,7$
после $+2^{\circ}\text{C}$		$187 \pm 31,7$	$1147 \pm 277,1$	$50,4 \pm 8,2$
Нейтрофилы	15	$285 \pm 59,9$	$1678 \pm 283,9$	$82,7 \pm 8,7$
после $+45^{\circ}\text{C}$		$281 \pm 58,5$	$1637 \pm 260,9$	$85,2 \pm 5,7$
Нейтрофилы	12	$238 \pm 13,8$	$1705 \pm 257,2$	$49,4 \pm 6,3$
после $-2^{\circ}\text{C}$		$245 \pm 10,9$	$1765 \pm 260,0$	$49,0 \pm 5,8$

Примечания: \* –  $p < 0,05$  от значения нейтрофилов; n – количество исследованных образцов лейкоцитных концентратов, НБЖ – небеременные женщины.



Влияние гормонов на активность НАДФН-оксидазы нейтрофилов после температурного воздействия по показателю хемиллюминограмм S: \* –  $p < 0,05$  от исходного значения показателя S, принятого условно за 100%

Экспозиция периферической крови здоровых доноров-добровольцев в течение 30 минут при +45 °С, согласно показателям хемилуминограмм, повышает чувствительность рецепторов нейтрофилов к гистамину, не влияет на чувствительность рецепторов нейтрофилов к инсулину, адреналину, а также рецепторов нейтрофилов крови небеременных женщин к эстрогену и прогестерону. Возможно, при повышении температуры окружающей среды до +45 °С на мембране нейтрофилов увеличивается количество гистаминовых, предположительно H<sub>1</sub>-рецепторов [5] за счет синтеза новых или вовлечения резерва имеющихся в клетке, или иного, что влияет на активность НАДФН-оксидазы и вызывает респираторный взрыв.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что температурный фактор имеет важное значение в регуляции бактерицидного механизма нейтрофилов. Возможность температурной модуляции активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов через рецепторы к прогестерону у женщин и гистамину у женщин и мужчин может стать новым путем управления эффекторными механизмами иммунитета.

#### Список литературы

1. Алексеев Н.А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов. – СПб.: Фолиант, 2002. – С. 388–391.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Долгушин И.И., Смирнова Т.Г., Савочкина А.Ю., Шишкова Ю.С., Долгушина В.Ф., Курносенко И.В. Влияние прогестерона на фагоцитарную, кислородзависимую бактерицидную функции нейтрофилов и их способность образовывать внеклеточные ловушки // Иммунология. – 2012. – № 5. – С. 243–245.
5. Искусных А.Ю., Башарина О.В., Артюхов В.Г., Алабовский В.В. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в крови доноров // Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2008. – № 1. – С. 93–96.
6. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – С. 24–48.
7. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 3–13.
8. Панасенко Л.М., Краснова Е.И., Ефремов А.В. Клиническое значение хемилуминосцентного ответа лейкоцитов крови при коклюше // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 117. – № 3. – С. 44–47.
9. Петракова О.В., Сыманович О.Ю., Хватова Л.А., Гурманчук И.Е. Особенности иммунологического действия инсулина и глюкозы на нейтрофилы и лимфоциты человека *in vitro* // Молодой ученый. Новые задачи современной медицины: мат-лы II междунар. конф. (Санкт-Петербург, май 2013). – СПб.: Реноме, 2013. – С. 27–29.
10. Шилов Ю.И., Орлова Е.Г., Ланин Д.В. Аднергические механизмы регуляции фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови при стрессе и введении гидрокортизола // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2004. – № 3. – С. 8–13.
11. Ширшев С.В., Куклина Е.М., Гудина У.С. Влияние эстрадиола на фагоцитарную и окислительную активность моноцитов и нейтрофилов // Вестник Пермского университета. – 2008. – Вып. 9(25). – С. 96–99.
12. Rhee S.G. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling // Science. – 2006. – № 312. – P. 1882–1883.

#### References

1. Alekseev N.A. Klinicheskie aspekty leykopeniy, neytropeniy i funktsionalnykh narusheniy neytrofilov. Saint-Petersberg: Foliant, 2002. pp. 388–391.
2. Belous A.M., Grischenko V.I. Kriobiologiya. Kiev: Naukova dumka, 1994. 432 p.
3. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika. 1998. 459 p.
4. Dolgushin I.I., Smirnova T.G., Savochkina A.Yu., Shishkova Yu.S., Dolgushina V.F., Kurnosenko I.V. Vliyanie progesterona na fagotsitarnuyu, kislorodzavisimuyu bakteritsidnyuyu funktsii neytrofilov i ih sposobnost obrazovyyivat vnekletochnyie lovushki // Immunology. 2012. no. 5. pp. 243–245.
5. Iskusnyih A.Yu., Basharina O.V., Artyuhov V.G., Alabovskiy V.V. Vliyanie gistamina na funktsionalnyie svoystva neytrofilov i intensivnost protsessov perekisnogo okisleniya lipidov v krovi donorov // Vestnik VGU, ser: Khim, Biol, Farm. 2008. no. 1. pp. 93–96.
6. Menshikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. Okislitelnyy stress. Prooksidanty i antioksidanty. Moscow: Slovo, 2006. pp. 24–48.
7. Mayanskiy A.N. NADFN-oksidaza neytrofilov: aktivatsiya i regulyatsiya // Tsitokiny i vospalenie. 2007. Vol. 6 (3). pp. 3–13.
8. Panasenko L.M., Krasnova E.I., Efremov A.V. Klinicheskoe znachenie hemilyuminescentnogo otveta leykotsitov krovi pri koklyushe // Bulletin SO RAMN. 2005. Vol. 117 (3). pp. 44–47.
9. Petrakova O.V., Syimanovich O.Yu., Hvatova L.A., Gurmanchuk I.E. Osobennosti immunologicheskogo deystviya insulina i glyukozy na neytrofily i limfotsity cheloveka *in vitro* // Molodoy ucheniy. Novyie zadachi sovremennoy meditsiny: mat-lyi II mezhd. konf. (Saint-Petersberg, may 2013) Saint-Petersberg: Renome, 2013. pp. 27–29.
10. Shilov Yu.I., Orlova E.G., Lanin D.V. Adnergicheskie mehanizmy regulyatsii fagotsitarnoy aktivnosti neytrofilov perifericheskoy krovi pri stresse i vvedenii gidrokortizola // Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya. 2004. no. 3. pp. 8–13.
11. Shirshv S.V., Kuklina E.M., Gudina U.S. Vliyanie estradiola na fagotsitarnuyu i okislitelnyuyu aktivnost monotsitov i neytrofilov // Vestnik Permskogo universiteta. 2008. Vol. 9 (25). pp. 96–99.
12. Rhee S.G. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling // Science. 2006. no. 312. pp. 1882–1883.

#### Рецензенты:

Шардаков В.И., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории иммунологии лейкозов, ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови» ФМБА России, г. Киров;  
Хлыбова С.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ИПО, ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» МЗ РФ, г. Киров.  
Работа поступила в редакцию 18.03.2015.