

Участие системы глутатиона в поддержании функционального состояния нейтрофилов при остром воспалении

Жаворонок Т.В.

Glutathione system participation on neutrophils functional status during acute inflammation

Zhavoronok T.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Жаворонок Т.В.

Проведено исследование состояния системы глутатиона (содержания восстановленного, окисленного, белково-связанного глутатиона, SH-групп белков и активности глутатионпероксидазы) и функциональных свойств (продукции гидроксильного радикала, интерлейкина-8, фактора некроза опухолей α и активности миелопероксидазы) нейтрофилов, полученных у больных внебольничной пневмонией. Выявлена роль восстановленной и белково-связанной форм глутатиона в регуляции активности миелопероксидазы и продукции гидроксильного радикала нейтрофилами крови в условиях инкубации клеток с блокатором синтеза глутатиона *de novo* бутионинсульфоксимин. Установлено, что для поддержания функционального состояния нейтрофилов более важен синтез глутатиона *de novo*, чем активность каталазы (ингибирование 3-амино-1,2,4-триазолом).

Ключевые слова: глутатион, нейтрофилы, острое воспаление, интерлейкины.

There was conducted the study of glutathione system status (the content of reduced, oxidized, protein-bound glutathione, SH-groups of proteins and glutathionperoxydase activity) and functional properties (the production of hydroxyl radical, IL-8, TNF- α and myeloperoxidase activity) of neutrophils received from people with community-acquired pneumonia. There was revealed the role of reduced and protein-bound glutathione in the regulation of myeloperoxidase activity and production of hydroxyl radical by blood neutrophils when incubating cells with glutathione synthesis blocker *de novo* (buthioninesulfoximine). and catalase inhibitor (3-amino-1,2,4-triazole). It was ascertained that glutathione synthesis *de novo* is more important than catalase activity (inhibition by 3-amino 1,2,4-triasole) to support neutrophil functional condition.

Key words: glutathione, neutrophils, acute inflammation, interleukins.

УДК 616-002-036.11:616.155.34:577.152.34

Введение

Развитие и исходы острого воспаления зависят от функционального состояния нейтрофилов. Интегральной частью воспалительного ответа считают гиперпродукцию нейтрофилами активных форм кислорода (АФК), способных вместе с провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухолей (TNF) α , интерферон- γ , интерлейкины (IL) 1, 8 и др.) поддерживать воспаление [4, 6]. Накопление АФК в самих нейтрофильных гранулоцитах может приводить к окислительной модификации макромолекул, нарушению функций, повреждению и гибели клеток вследствие развития окислительного стресса (ОС) [6, 8, 10]. Основой защиты клеток от повреждающего действия АФК служит восстановительный потенциал системы

глутатиона (GSH), который определяет редокс-состояние нейтрофилов и влияет на эффективность их функционирования [5—7]. GSH выступает акцептором АФК [7, 14], кофактором ряда ферментов антиоксидантной и детоксикационной систем [3, 6, 15], участвует в экспрессии редокс-чувствительных генов, регуляции внутриклеточной сигнализации [5, 7, 13]. Изучение механизмов поддержания редокс-состояния GSH в нейтрофилах актуально в плане поиска путей увеличения эффективности функционирования этих клеток как эффекторов острого воспаления.

Цель работы — оценить роль системы глутатиона в механизмах изменений функциональных свойств нейтрофильных лейкоцитов крови при внебольничной пневмонии (ВП).

Материал и методы

Обследовано 48 больных (23 мужчины и 25 женщин в возрасте (36 ± 4) года) внебольничной пневмонией средней степени тяжести, поступивших в стационар в порядке скорой медицинской помощи. Диагноз соответствовал современным стандартам диагностики ВП [9]. Группу контроля составили 27 здоровых доноров (10 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 18 до 50 лет (средний возраст (33 ± 6) лет). Материалом для исследования служила венозная кровь, полученная с использованием вакуумных систем BD Vacutainer (Greiner-bio-one, Австрия), с гепарином лития до проведения терапии.

Нейтрофильные лейкоциты выделяли на двойном градиенте Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 и 1,093 г/см³, трижды отмывали средой RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и готовили суспензию клеток, стандартизованную до $2 \cdot 10^6$ в 1 мл. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с 0,5%-м трепановым синим (Serva, США) составляла 95%. Клетки культивировали с полной питательной средой, содержащей 90% RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия), инактивированную при температуре 56 °C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль Нерес (Flow, Великобритания). Для оценки роли системы GSH в поддержании функционирования нейтрофилов их инкубировали с бутионинсульфоксимином (BSO) с концентрацией 1 ммоль (Sigma, США) — блокатором ключевого фермента синтеза глутатиона γ -глутамилцистеинсинтазы [12] или 3-амино-1,2,4-триазолом (AT) с концентрацией 2 ммоль (Sigma, США) — ингибитором каталазы [14], исключая влияние фермента на редокс-статус и функционирование нейтрофилов.

В среде инкубации нейтрофилов оценивали содержание TNF- α и IL-8 ИФА-тест-системами (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), продукцию клетками NO^{*} по содержанию продуктов разрушения модельного субстрата — раствора 2-дезоксид-рибозы (MP, США) в концентрации 15 ммоль [1]. Часть суспензии нейтрофилов лизировали с 1%-м тритоном X-100, сохраняя стандартную концентрацию клеток, далее определяли: активность миелопероксидазы (MPO), учитывая преобразование о-фенилендиамина (MP, США) [1], глутатионпероксидазы (GPO), катализирующей реакцию GSH и гидроперекиси т-бутила [1], содержание сульф-

гидрильных SH групп белка (белок SH) и связанного с белком GSH (белок SSG) методом S. Kojima и соавт. [13], учитывая способность 1%-го боргидрида натрия (Sigma, США) высвобождать GSH из связи с белками. Лизат клеток депротенинировали 5%-й сульфосалициловой кислотой и оценивали содержание GSH и его окисленной формы (GSSG) методом S. Kojima и соавт. [11], основанным на ферментативной реакции рециркуляции и блокировании SH-групп GSH винилпирилидином (Wako, Япония). Количество белка в пробах определяли методом Бредфорд, основанным на окрашивании аргинина и лизина в белках Кумасси голубым G-250.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Результаты представлены в таблицах в виде медианы *Me*, верхнего и нижнего квартилей Q_1 — Q_3 . Для оценки нормальности распределения показателей использовали тест Шапиро—Уилки, достоверности различий независимых выборок — ранговый критерий Манна—Уитни, зависимых выборок — непараметрический критерий Вилкоксона. Для выявления взаимосвязей между показателями, оценки их силы и направления применяли корреляционный анализ Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У пациентов с ВП в нейтрофилах зарегистрировано увеличение продукции IL-8, TNF- α , секреции NO^{*} и активности MPO в сравнении с показателями в контрольной группе ($p < 0,05$) (таблица). Повышение продукции цитокинов и АФК является следствием функциональной перестройки нейтрофилов с целью выполнения ими защитной функции по элиминации флогогенов.

Оценка состояния системы глутатиона в нейтрофильных лейкоцитах крови при ВП показала снижение содержания GSH, белка SH, индекса GSH/GSSG (в 3,0; 1,9 и 6,5 раза соответственно) и рост концентрации GSSG и белка SSG (в 1,7 и 11,6 раза соответственно) относительно контрольных величин ($p < 0,05$) (таблица). Следовательно, зарегистрированное снижение внутриклеточного фонда GSH во многом обусловлено связыванием трипептида с функциональными SH-группами белков, что препятствует их необратимой инактивации. Недостаток GSH в нейтрофилах при ВП способствовал

угнетению антиоксидантной активности GPO в 1,6 раза по сравнению с показателем в контроле ($p < 0,05$).

Влияние блокатора синтеза глутатиона и ингибитора каталазы на состояние системы глутатиона и функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с внебольничной пневмонией (Me (Q₁—Q₃))

Группа обследованных		GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH / GSSG	Белок SH, нмоль/мг белка	Белок SSG, нмоль/мг белка	GPO, нмоль/(мин·мг белка)	НО [*] , нмоль/мг белка	MPO, усл. ед./мг белка	IL-8, пг/мл	TNF-α, пг/мл
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	4,84 (4,64—5,39)	0,27 (0,25—0,31)	18,57 (16,72—19,37)	3,15 (2,83—3,39)	0,05 (0,03—0,08)	160,60 (132,61—174,20)	25,32 (19,87—27,60)	715,80 (669,80—741,10)	281,10 (273,71—304,10)	124,52 (89,02—156,00)
	Интактные нейтрофилы	1,62 (1,23—1,92)*	0,47 (0,37—0,66)*	2,84 (2,45—4,67)*	1,69 (1,50—1,93)*	0,58 (0,47—0,70)*	97,66 (89,78—113,5)*	46,79 (40,64—52,74)*	832,00 (747,80—924,01)*	325,91 (312,91—335,40)*	168,31 (153,27—171,47)*
Пациенты с ВП	Нейтрофилы, инкубированные с АТ	1,33 (1,09—1,71)* **	0,58 (0,51—0,69)*	2,03 (2,04—2,69)*	1,58 (1,50—1,83)*	0,63 (0,61—0,81)*	57,84 (49,45—73,69)*	27,44 (18,28—35,05)**	746,7 (562,9—822,8)	305,51 (270,73—371,30)*	144,60 (125,10—176,90)*
	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	0,85 (0,81—0,96)* **	0,66 (0,57—0,76)* **	1,43 (1,31—1,70)* **	0,28 (0,25—0,34)* **	0,65 (0,61—0,70)*	39,53 (35,20—42,78)* **	32,56 (24,38—36,64)**	615,59 (571,89—686,89)* **	320,50 (290,32—340,12)*	153,90 (135,90—164,60)*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями в интактных нейтрофилах у здоровых доноров.

** $p < 0,05$ по сравнению с показателями в интактных нейтрофилах у больных ВП.

Редокс-чувствительные тиоловые группы GSH и белков расходуются для защиты клетки от избытка НО^{*} и других АФК [5, 11].

Культирование нейтрофилов крови пациентов с ВП в условиях блокады синтеза GSH *de novo* приводило к дополнительному снижению содержания GSH, свободных тиоловых групп белков, коэффициента GSH/GSSG и активности GPO (в 1,9; 6,0; 2,0 и 2,5 раза соответственно) по сравнению с аналогичными параметрами в интактных нейтрофилах, полученных у больных ВП ($p < 0,05$). При этом содержание белка SSG оставалось на прежнем уровне, что указывает на нарушение механизмов глутатионирования в защите тиоловых центров белков от окислительной деградации.

Добавление BSO в среду инкубации нейтрофилов, праймированных в условиях ВП, снижало образование НО^{*} и активность MPO в 1,4 раза относительно аналогичных значений в клетках, культивированных в отсутствие блокатора синтеза GSH ($p < 0,05$) (таблица). На фоне низкого уровня GSH в клетках при ВП блокада его дополнительного синтеза могла усилить процессы окислительной модификации белка, приводящие к повреждению активных центров MPO, а также НАДФ-оксидазы и супероксиддисмутазы, участ-

вующих в образовании субстрата для MPO [4]. В результате повышение активности MPO полностью нивелировалось, более того, показатель становился в 1,2 раза меньше величин, регистрируемых у здоровых доноров ($p < 0,05$). Подтверждением данного предположения является наличие положительной корреляционной связи между содержанием GSH и активностью MPO при инкубации с BSO нейтрофилов, полученных у больных ВП ($r = 0,61$; $p < 0,05$).

Однако усугубление дефицита GSH за счет отсутствия его синтеза *de novo* не было абсолютно фатальным для функциональной активности нейтрофилов. Добавление BSO в среду инкубации не влияло на продукцию клетками TNF-α и IL-8, выступающего ключевым стимулятором созревания и хемотаксиса нейтрофилов в очаг воспаления. Вероятно, происходило перераспределение пула GSH для обеспечения связывания фактора NF-κB с ДНК и поддержания синтеза цитокинов, регулирующих работу эффекторных клеток воспаления. Низкий уровень GSH в клетках влияет на связывание фактора NF-κB в ядре, поскольку активация факторов транскрипции и их контакт с регуляторными сайтами ДНК контролируется редокс-гомеостазом, основным показателем которого служит соотношение SH-групп и их SS-варианта [6, 7].

Синтез GSH *de novo* в сравнении с активностью каталазы вносит более существенный вклад в поддержание редокс-потенциала нейтрофилов, определяющего их функциональное состояние при остром воспалении. Ингибирование каталазы АТ в нейтрофилах пациентов с ВП приводило к компенсаторному перерасходу GSH и низкой активности GPO ($p < 0,05$), не влияя на активность MPO и продукцию цитокинов; регистрировалось лишь снижение образования HO^{\bullet} в 1,7 раза по сравнению со значением параметра в нейтрофилах, инкубируемых без блокатора ($p < 0,05$). Известно, что ингибирование каталазы с помощью АТ сопровождается снижением активности ряда чувствительных к окислению ферментов, продукты которых участвуют в реакции Фентона, протекающей с образованием HO^{\bullet} [2].

Заключение

Таким образом, нарушение функциональных свойств нейтрофилов крови (возрастание продукции HO^{\bullet} , IL-8, TNF- α и активности MPO) при остром воспалении сопровождается дисбалансом редокс-статуса клеток. Механизмы дисрегуляции редокс-зависимых систем нейтрофилов у пациентов с внебольничной пневмонией сопряжены со снижением емкости системы глутатиона (рост содержания его окисленной и белково-связанной форм при низких концентрациях его восстановленной формы и тиоловых групп белков). Ингибирование синтеза глутатиона *de novo* с помощью BSO угнетает кислородзависимые механизмы функциональной активности нейтрофилов (способность к продукции HO^{\bullet} и активность MPO), необходимые для обеспечения микробицидной функции, и не влияет на синтез цитокинов IL-8 и TNF- α . Блокирование каталазы с помощью ингибитора АТ компенсируется заместительным вкладом системы глутатиона в поддержание редокс-потенциала нейтрофилов при ВП, что отражается на функциональной активности клеток только снижением продукции HO^{\bullet} .

В статье представлены результаты исследований, выполненных в рамках проекта, поддержанного Советом по грантам при Президенте РФ (НШ-2334.2008.7).

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбин Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. 103 с.

2. Байляк М.М., Господарев А.В., Семчушкин Г.М., Луцук В.И. Ингибирование каталазы аминотриазолом приводит к снижению активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. 2008. Т. 73, вып. 4. С. 15—23.
3. Жаворонок Т.В., Степовая Е.А., Рязанцева Н.В. и др. Закономерности нарушения окислительного метаболизма при острых воспалительных заболеваниях // Клинич. лаб. диагностика. 2006. № 12. С. 10—14.
4. Коваленко Е.И., Семенкова Г.Н., Черенкевич С.Н. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу *in vitro* // Цитология. 2007. Т. 49, № 10. С. 837—847.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции // Биомед. химия. 2009. Т. 55, В. 4. С. 365—379.
6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Реутов В.П. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: МАИК, 2006. 556 с.
7. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. Т. 72, № 2. С. 158—174.
8. Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Стариков Ю.В. и др. Влияние молекулы оксида азота на программированную гибель нейтрофильных лейкоцитов в условиях окислительного стресса *in vitro* // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2008. Т. 146, № 12. С. 646—650.
9. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. Пневмония. М.: Экономика и информатика, 2006. 464 с.
10. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B. et al. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // J. of Cell Biology. 1978. V. 76, № 2. P. 439—447.
11. Kojma S., Nadayama K.H., Ishida H. Low dose j-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth // J. Radiat. Res. 2004. V. 45. P. 33—39.
12. Laragione T., Bonetto V., Casoni F. et al. Redox regulation of surface protein thiols: Identification of integrin-4 as a molecular target by using redox proteomics // PNAS. 2003. V. 100, № 25. P. 14737—14741.
13. Pietarinen-Runtti P., Lakari E., Raivio K.O., Kinnula V.L. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells // J. Physiol. Cell Physiol. 2000. V. 278, № 1. P. 118—125.
14. Spolarics Z., Wu J.-X. Role of glutathione and catalase in H_2O_2 detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells // J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1997. V. 273. P. 1304—1311.
15. Zhu Y., Carvey P.M., Ling Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide // Neurochem. Int. 2007. V. 50, № 4. P. 671—680.

Поступила в редакцию 17.03.10.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2010 г.

Сведения об авторах

Т.В. Жаворонок — канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Татьяна Васильевна Жаворонок, тел.: 8 (3822) 42-09-22, 8-961-097-4530, факс 8 (3822) 53-33-09, e-mail: tavaza@ngs.ru

Влияние блокатора синтеза глутатиона и ингибитора каталазы на состояние системы глутатиона и функциональные свойства нейтрофилов крови у пациентов с внебольничной пневмонией (Me (Q₁—Q₃))

Группа обследованных		GSH, нмоль/мг белка	GSSG, нмоль/мг белка	GSH / GSSG	Белок-SH, нмоль/мг белка	Белок-SSG, нмоль/мг белка	GPO, нмоль/(мин·мг белка)	НО ⁺ , нмоль/мг белка	MPO, усл. ед./мг белка	IL-8, пг/мл	TNF-α, пг/мл
Здоровые доноры	Интактные нейтрофилы (контроль)	4,84 (4,64—5,39)	0,27 (0,25—0,31)	18,57 (16,72—19,37)	3,15 (2,83—3,39)	0,05 (0,03—0,08)	160,60 (132,61—174,20)	25,32 (19,87—27,60)	715,80 (669,80—741,10)	281,10 (273,71—304,10)	124,52 (89,02—156,00)
	Интактные нейтрофилы	1,62 (1,23—1,92)*	0,47 (0,37—0,66)*	2,84 (2,45—4,67)*	1,69 (1,50—1,93)*	0,58 (0,47—0,70)*	97,66 (89,78—113,5)*	46,79 (40,64—52,74)*	832,00 (747,80—924,01)*	325,91 (312,91—335,40)*	168,31 (153,27—171,47)*
	Нейтрофилы, инкубированные с АТ	1,33 (1,09—1,71) * **	0,58 (0,51—0,69)*	2,03 (2,04—2,69)*	1,58 (1,50—1,83)*	0,63 (0,61—0,81)*	57,84 (49,45—73,69)*	27,44 (18,28—35,05) **	746,7 (562,9—822,8)	305,51 (270,73—371,30)*	144,60 (125,10—176,90)*
Пациенты с ВП	Нейтрофилы, инкубированные с BSO	0,85 (0,81—0,96) * **	0,66 (0,57—0,76) * **	1,43 (1,31—1,70) * **	0,28 (0,25—0,34) * **	0,65 (0,61—0,70)*	39,53 (35,20—42,78) * **	32,56 (24,38—36,64) **	615,59 (571,89—686,89) * **	320,50 (290,32—340,12)*	153,90 (135,90—164,60)*

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями в интактных нейтрофилах у здоровых доноров.

** $p < 0,05$ по сравнению с показателями в интактных нейтрофилах у больных ВП.