

ВЛИЯНИЕ ГИСТАМИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССА ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КРОВИ ДОНОРОВ

А. Ю. Искусных¹, О. В. Башарина², В. Г. Артюхов², В. В. Алабовский¹

¹ Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко,

² Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 06.03.2008 г.

Аннотация. Проведено комплексное исследование по влиянию гистамина (10^{-5} – 10^{-2} моль/л) на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и интенсивность процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в крови доноров. Показано корригирующее действие биогенного амина на содержание в крови доноров диеновых конъюгатов и кетодиенов. С использованием метода люцигенинзависимой хемилюминесценции выявлено корригирующее действие гистамина в концентрации 10^{-4} моль/л на активность НАДФН-оксидазы нейтрофилов при добавлении биогенного амина в кровь, а также активация НАДФН-оксидазы и снижение активности миелопероксидазы при добавлении гистамина к суспензии нейтрофилов доноров. Показана возможность взаимной функциональной компенсации НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы нейтрофилов в присутствии гистамина. Полученные данные использованы для обсуждения гомеостатических механизмов воспаления.

Ключевые слова: нейтрофилы, гистамин, активные формы кислорода, пероксидное окисление липидов

Abstract. We performed complex research of influence of histamine (10^{-5} – 10^{-2} mol/l) on production of reactive oxygen species by neutrophils and intensity of lipid peroxidation in the blood of donors. We demonstrated corrugated influence of biogenic amine on the content of dien conjugates and ketodien in the blood of donors. With the use of methods of lucigenin – dependent chemiluminescence we revealed corrugated influence of histamine in concentration 10^{-4} mol/l on the activity of NADPH-oxidase of neutrophils and decreased activity of myeloperoxidase after addition of histamine to the suspension of neutrophils of donors. We demonstrated the possibility of mutual functional compensation of NADPH-oxidase and myeloperoxidase of neutrophils in the presense of histamine. These results are used for the discussion of homeostatic mechanism of inflammation.

Key words: neutrophils, histamine, reactive oxygen species, lipid peroxidation

ВВЕДЕНИЕ

Гистамин (β -имидазолин-4(5)-этиламин) — биогенный амин, образующийся в организме в результате декарбоксилирования гистидина под действием специфической декарбоксилазы и играющий важную роль в регуляции многих физиологических функций. Специфические блокаторы гистаминовых рецепторов широко используются в лечении ряда серьезных патологических состояний, связанных с нарушениями обмена гистамина, таких как аллергические и псевдоаллергические реакции, воспаление, инфекционный процесс. Ведущим патогенетическим звеном большинства из них является окислительный стресс. К биохимическим проявлениям окислительного стресса относят усиление продукции активных форм кислорода (АФК), пероксидного окисления липидов,

активация, а затем быстрое истощение систем антиоксидантной защиты тканей.

Основной источник АФК в организме — нейтрофильные гранулоциты крови. В низких концентрациях ($\sim 10^{-6}$ моль/л) при взаимодействии с H_1 -рецепторами на мембране нейтрофилов гистамин вызывает респираторный взрыв, сопровождающийся выбросом в кровь активных форм кислорода (АФК), инициирующих процесс пероксидного окисления липидов (ПОЛ), что лежит в основе его медиаторного действия при воспалении [1, 2]. В более высоких концентрациях ($\sim 10^{-5}$ моль/л) биогенный амин через H_2 -рецепторы снижает хемилюминесцентный (ХЛ) ответ нейтрофилов [3] и оказывает противовоспалительное действие [4].

Кроме того, известно, что гистамин и родственные соединения (гистидин, карнозин) могут проявлять антирадикальную активность, которая определяется, в первую очередь, имидазольным

кольцом, входящим в состав их молекул [5]. Так, в работе [6] показана способность гистамина к взаимодействию с $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , $\cdot OH$ и H_2O_2 . Mc Erickson и Н. Hultin [7] показали возможность участия гистидина в редокс-цикле железа, в формировании различных его комплексов, а также способность предшественника гистамина выступать в качестве активатора или ингибитора ПОЛ в модельных системах и высказали предположение, что эта аминокислота может модулировать ПОЛ *in vivo*.

Так как в литературе недостаточно освещены механизмы действия гистамина на функциональное состояние нейтрофилов и на интенсивность процессов ПОЛ, целью настоящей работы стало изучение влияния биогенного амина на активность миелопероксидазы (МПО) (КФ 1.11.1.7) и НАДФН-оксидазной системы нейтрофилов, а также на содержание продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов и кетодиенов в крови доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К 2 мл гепаринизированной крови или суспензии нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) доноров (20 человек) добавляли гистамин в концентрациях 10^{-5} – 10^{-2} моль/л (конечная концентрация -10^{-7} – 10^{-4} моль/л). Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) определяли по оптической плотности гептановых экстрактов при 232 нм (ДК) и 273 нм (КД) на спектрофотометре СФ-46 [8]. Нейтрофилы выделяли на двойном градиенте плотности фиколл — урографин ($\rho = 1,077$ и $1,119$ г/мл) [9]. Определение функциональной активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов проводили путем измерения люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на приборе БХЛ-06 М. Активность МПО определяли по степени окисления тетраметилбензидина [10]. Достоверность различий оценивали методом попарных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По характеру влияния гистамина (10^{-5} – 10^{-2} моль/л) на содержание в крови продуктов ПОЛ нами было выделено две группы доноров.

У доноров первой группы исходное содержание в крови ДК и КД было более низким (рис. 1). Добавление гистамина в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} моль/л приводило к увеличению содержания ДК на 147 и 104 % и КД — на 46 и 40 % соответственно; гистамин в концентрации 10^{-3} моль/л повышал только уровень ДК в крови доноров первой группы. У второй группы при добавлении гистамина в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} моль/л на-

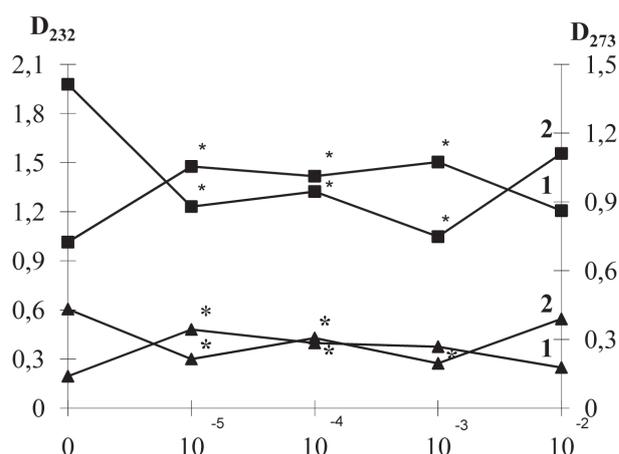


Рис. 1. Влияние гистамина на содержание диеновых конъюгатов и кетодиенов в крови доноров. Обозначения: 1, 2 — группы доноров; * — отличия от контроля (без модификатора) достоверны ($p < 0,05$)

блюдалось снижение интенсивности процессов ПОЛ на 38, 33 и 47 % по показателю ДК и на 50, 29 и 55 % — по показателю КД соответственно.

Таким образом, гистамин в указанных концентрациях увеличивает интенсивность ПОЛ у доноров с исходно более низкими показателями и снижает содержание ДК и КД в крови доноров с более высоким уровнем ПОЛ, из чего можно сделать вывод о корригирующем действии модификатора на тестируемые параметры.

Для анализа влияния гистамина на активность НАДФН-оксидазы нами было проведено исследование люцигенинзависимой хемилюминесценции нейтрофилов доноров при добавлении биогенного амина (10^{-4} моль/л) в кровь.

Показано, что по уровню активности НАДФН-оксидазы доноры образуют две группы (рис. 2). Добавление гистамина приводило к повышению исследуемого показателя у доноров 1-й группы и снижало активность ферментного комплекса у 2-й группы доноров.

Чтобы понять механизм такого неоднонаправленного действия гистамина на нейтрофилы, мы провели серию экспериментов по влиянию данного медиатора (10^{-4} моль/л) на суспензию клеток. Выявлено повышение максимального люцигенинзависимого хемилюминесцентного ответа у всех доноров, тогда как миелопероксидазная активность клеток у тех же доноров снижалась (рис. 3). Обратная связь ХЛ-ответа с активностью МПО при данной концентрации модификатора является результатом последовательного ряда событий, развивающихся при взаимодействии гистамина с мемб-

ранами исследуемых клеток. Существует мнение [11], что миелопероксидазная и НАДФН-оксидазная активности нейтрофилов в определенных условиях могут компенсировать друг друга. Так, недостаток активности МПО компенсируется возрастанием продукции O_2^- и, вероятно, альтернативным метаболизмом H_2O_2 , при котором пероксид водорода превращается не в $HOCl$, а, например, в OH -радикалы. Полученные нами данные под-

тверждают предположение о возможности взаимной функциональной компенсации НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы фагоцитов доноров.

Наличие на мембране нейтрофила двух типов гистаминовых рецепторов противоположного характера действия само по себе обуславливает возможность корректирующего влияния гистамина на функциональную активность клетки, что подтверждено нами в экспериментах с добавлением гистамина к цельной крови и к суспензии нейтрофилов. Инкубация суспензии нейтрофилов доноров с гистамином (с учетом разведения — 10^{-6} моль/л) приводила к увеличению интенсивности люцигенинзависимой хемиллюминесценции клеток, тогда как добавление гистамина к цельной крови оказывало корректирующее действие на активность НАДФН-оксидазной ферментной системы, что, вероятно, связано с различным исходным содержанием биогенного амина в крови доноров.

Большинство исследователей рассматривает воспаление как защитно-приспособительную гомеостатическую реакцию [12]. Являясь основным медиатором воспалительного процесса в организме, гистамин, как показано нами, участвует в регуляции центральных звеньев воспаления — функционального состояния нейтрофилов и интенсивности процессов ПОЛ. Взаимодействуя со специфическими рецепторами на мембранах нейтрофилов, увеличивая или снижая таким образом функциональную активность клеток, гистамин способен участвовать в регуляции уровня активных кислородных метаболитов в крови.

Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что одной из составляющих гомеостатической природы воспаления является способность гистамина путем регулирования содержания АФК, корректировать уровень ПОЛ в крови доноров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бережная Н.М.* Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз / Н.М. Бережная. — Киев, 1988. — 192 с.
2. *Benbarek H., Monithys-Mickalad A., Deby-Dupont G. et al.* // *Inflam.Res.* 1999. Vol. 48. P. 594 — 601.
3. *Донцов В.И.* Галавит — новый иммуномодулятор с биоактивирующим и регенерирующим эффектом / В.И. Донцов, А.А. Подколзин // Ежегодник национального геронтологического центра. — 2001. — в. 4. — С. 70—80.
4. *Спасов А.А.* Гистамин: рецепторы и гистаминергические вещества (обзор) / А.А. Спасов, М.В. Черников // *Химико-фармацевтический журнал.* — 2002. — N 8. — С. 3—15.

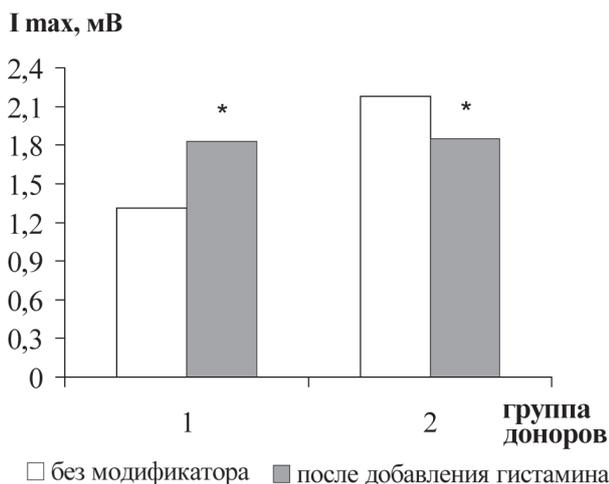


Рис. 2. Влияние гистамина, добавленного в кровь доноров, на интенсивность люцигенинзависимой хемиллюминесценции нейтрофилов. Обозначения: * — отличия от контроля (без модификатора) достоверны ($p < 0,05$)

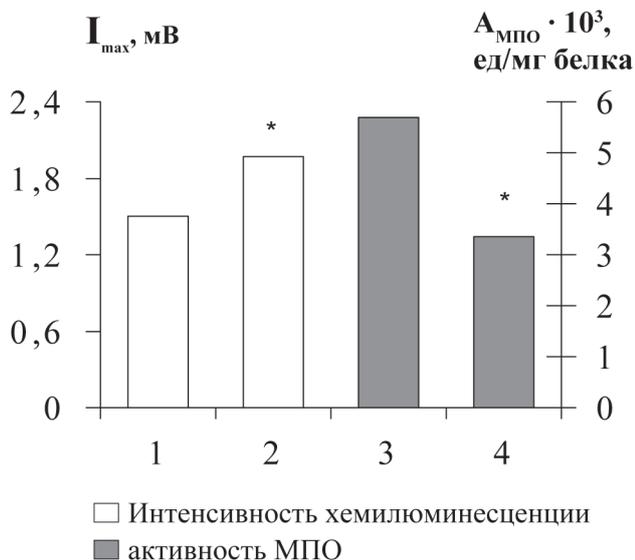


Рис. 3. Влияние гистамина, добавленного к суспензии нейтрофилов, на интенсивность их люцигенинзависимой хемиллюминесценции и активность МПО. Обозначения: 1, 3 — контроль; 2, 4 — в присутствии гистамина (10^{-4} моль/л); * — отличия от контроля (без модификатора) достоверны ($p < 0,05$)

5. Matheson I.B. Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen / I.B. Matheson, J. Lee // Photochem. and photobiol. — 1979. — Vol. 29, N 5. — P. 879—881.

6. Агишева Н.В. Фотоиндуцированные изменения структурно-функциональных свойств некоторых изоформ лактатдегидрогеназы в присутствии биогенных аминов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н.В. Агишева. — Воронеж, 2002. — 27 с.

7. Mc Erickson. Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum / Mc Erickson, H. Hultin // Arch. Biochem. Biophys. — 1992. — Vol. 292, N 2. — P. 427—432.

8. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. // Лабораторное дело. 1988, N2. С. 60—64.

9. Лобашевский А.Л. Выделение полиморфно-ядерных лейкоцитов из малых объемов крови после осаждения декстраном / А.Л. Лобашевский // Лабораторное дело. — 1983. — N 11. — С. 28—31.

10. Бакуев М.М. Особенности секреции миелопероксидазы и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы / М.М. Бакуев, М.З. Саидов // Иммунология. — 1991. — N 1. — С. 15—18.

11. Gerber C.E., Zipfel M., Niethammer D. et al. // Eur. J. Clin. Biochem. 1996. Vol. 34. P. 901—908.

12. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. Руководство для врачей. Москва, 1995 — 640 с.

Искусных Анна Юрьевна — ассистент кафедры биохимии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко; тел. (4732) 530-338, e-mail: pli807@mail.ru

Башарина Ольга Владимировна — доцент кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-981

Артюхов Валерий Григорьевич — профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета; тел. (4732) 208-981

Алабовский Владимир Владимирович — профессор, зав. кафедрой биохимии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко; тел. (4732) 530-375

Iskusny Anna.Yu. — candidate of biological sciences, assistant of Department of Biochemistry, N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy; tel. (4732) 530-338, e-mail: pli807@mail.ru

Basharina OlgaV. — candidate of biological sciences, dozent of Department of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University; tel.: (4732) 208-981

Artyukhov Valeri G. — doctor of biological sciences, professor, Head of Department of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University; tel.: (4732) 208-981

Alabovsky Vladimir V. — professor, Head of Department of Biochemistry, Voronezh N.N. Burdenko State Medical Academy; tel.: (4732) 530-375