

**Barbara Poniedziałek*, Krzysztof Piersiala*, Jacek Karczewski*,
Jakub Żurawski*, Mirosława Kaszkowiak***

**WPŁYW OŁOWIU NA WYBUCH ODDECHOWY GRANULOCYTÓW
OBOJĘTNOCHŁONNYCH CZŁOWIEKA *IN VITRO***

**INFLUENCE OF LEAD ON RESPIRATORY BURST OF HUMAN
NEUTROPHILS *IN VITRO***

Słowa kluczowe: neutrofile, wybuch oddechowy, ołów, cytometria przepływową.

Key words: neutrophils, respiratory burst, lead, flow cytometry.

The influence of heavy metal salt solutions in three different concentrations on human neutrophil respiratory burst in vitro was evaluated by means of flow cytometry.

Whole blood samples collected from healthy subjects were incubated with lead acetate ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) solutions at three different concentrations (1 μM , 10 μM i 100 μM) for 60 minutes. The incubation was followed by stimulation with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), a strong stimulator of neutrophil respiratory burst. A cytometrical analysis of respiratory burst activity was performed using dihydrorhodamine as a fluorescent marker. The results showed the downregulation of neutrophil respiratory burst activity after the 60-minute incubation with lead acetate.

1. WPROWADZENIE

Ołów jest jednym z metali ciężkich, zaliczanych do priorytetowych zanieczyszczeń środowiska i żywności. Wraz z kadmem i rtęcią uważany jest za pierwiastek stanowiący szczególne zagrożenie dla zdrowia człowieka [Urbanek-Karłowska 1993].

* *Dr n. med. Barbara Poniedziałek, Krzysztof Piersiala, dr n. med. Jacek Karczewski, dr n. biol. Jakub Żurawski, mgr inż. Mirosława Kaszkowiak – Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań; tel.: 61 853 05 71; e-mail: basiapon@wp.pl*

Wśród najistotniejszych źródeł narażenia na ołów wymienia się farby ołowiowe, glebę i kurz (w wyniku emisji ze źródeł przemysłowych), wodę pitną (przy stosowaniu elementów ołowianych w sieci wodociągowej), powietrze (głównie na obszarach silnie uprzemysłowionych) oraz żywność. Ocenia się, że nawet do 80% zawartości ołowiu w organizmie człowieka pochodzi ze spożywanego pokarmu [Jakubowski 1993; Zielińska 2001].

Po wchłonięciu przez układ pokarmowy lub oddechowy ołów jest łatwo adsorbowany do krwi. Pierwiastek ten wykazuje zdolność do kumulacji, głównie w tkance kostnej, gdzie jego okres półtrwania może wynosić nawet 30 lat. Także wątroba i nerki mają skłonność do bioakumulacji tego metalu [Urbanek-Karłowska 1993].

Zaburzenia powodowane ołowiem mogą mieć charakter ostry lub przewlekły. Do najczęstszych zatruc ostrych zalicza się kolkę ołowiczą, która może prowadzić do paraliżu i śpiączki [Jakubowski 1993]. Znacznie częściej obserwuje się przewlekłe działanie ołowiu. Może ono między innymi prowadzić do inhibicji syntezy hemoglobiny na różnych etapach syntezy hemu i skrócenia czasu przeżycia erytrocytów, demielinizacji lub zmian zwyrodnieniowych aksonu prowadzących do zaburzeń w układzie nerwowym, różnorodnych zmian w układzie immunologicznym, degradacyjnego wpływu na nerki, wpływu na układ sercowo-naczyniowy, zaburzeń funkcji układów endokrynnego i rozrodczego oraz uszkodzeń wywołanych zaburzeniami równowagi między wytwarzaniem a unieczynnianiem reaktywnych form tlenu (RFT) [Jakubowski 1993; Zielińska 2001; Ding 2000; Gurer 1999; Stohs 1995].

Neutrofile, czyli granulocyty obojętnochłonne, to wyspecjalizowane białe krwinki, biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. Często stanowią pierwszą linię obrony przed infekcjami, a niedobory ilościowe lub jakościowe tych komórek prowadzą do spadku odporności [Van Eeden 1999].

Po dotarciu na miejsce przebiegu procesu zapalnego neutrofile rozpoznają, a następnie fagocytują patogenne drobnoustroje. Wewnątrzkomórkowe zabijanie pochłoniętych patogenów odbywa się na drodze mechanizmów niezależnych lub zależnych od tlenu [Van Eeden 1999]. Mechanizm zależny od tlenu jest nazywany wybuchem oddechowym, polega on na produkcji wielu RFT i użyciu ich do degradacji patogenów.

Wybuch oddechowy jest inicjowany utworzeniem aktywnego kompleksu enzymu – oksydazy NADPH. Umożliwia on produkcję anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) w wyniku przemieszczenia elektronu z NADPH na tlen cząsteczkowy. Powstały $O_2^{\cdot-}$ może ulec spontanicznej lub katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową dysmutacji do nadtlenu wodoru (H_2O_2). W obecności jonów żelazawych powstają rodniki hydroksylowe ($\cdot OH$), a dzięki działaniu mieloperoksydazy powstaje kwas podchlorawy (HOCl), który może reagować z aminami, tworząc chloraminy [Torres 2005].

Reaktywne formy tlenu (RFT) wykazują zróżnicowaną toksyczność i aktywność bójczą. Za najbardziej aktywne w zabijaniu bakterii uważa się rodniki hydroksylowe, kwas podchlorawy i chloraminy [Torres 2005].

Celem badań prezentowanych w niniejszym opracowaniu było zbadanie wpływu różnego stężenia octanu ołowiu (II) na wybuch oddechowy neutrofilów krwi obwodowej człowieka *in vitro* (rys. 1).

2. MATERIAŁY I METODY

Do badań wykorzystano próbki krwi od zdrowych dawców (2,5 ml), pobranej na heparynę litową, zakupione w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu. Czas, który upływał od momentu pobrania próbki do zakończenia procedury badawczej, nie przekraczał sześciu godzin.

Wyjściowy roztwór octanu ołowiu (II) otrzymano przez rozpuszczenie 1,5172 g $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ w jednym litrze wody destylowanej. Roztwór przechowywano następnie w temperaturze 4°C.

Do oceny wybuchu oddechowego użyto roztworu dihydrorodaminy (123 DHR, Sigma, USA), rozpuszczając 1 mg substancji w 1 ml wody destylowanej. Roztwór przechowywano następnie w temperaturze -20°C, a bezpośrednio przed każdym doświadczeniem rozcieńczano w wodzie destylowanej, uzyskując ostatecznie stężenie 0,01 mg/ml. Zastosowano silny stymulator wybuchu oddechowego; 12-myristynian, 13-octan forbolu, (PMA, Sigma, USA) prowadzący do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu *in vitro*. Roztwór PMA uzyskano rozpuszczając 1 mg substancji w 1 ml 96-procentowego etanolu, uzyskując stężenie 1 mg/ml; roztwór przechowywano następnie w temperaturze -20°C.

W celu usunięcia z prób erytrocytów użyto płynu lizującego, przygotowanego samodzielnie: w 1 litrze wody destylowanej rozpuszczono 8,26 g chlorku amonu (NH_4Cl), 1,0 g węglanu potasu (K_2CO_3) oraz 0,037 g soli czterosodowej EDTA; otrzymany roztwór miał pH w granicach od 7,2 do 7,4 i był przechowywany w temperaturze 4°C.

Schemat przygotowania prób przedstawiono w tabeli 1. Zastosowano następujące oznaczenia:

- K- : kontrola ujemna, niestymulowana PMA,
- K+ : kontrola dodatnia, stymulowana PMA,
- 1- : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 1 μM , niestymulowana PMA,
- 1+ : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 1 μM , stymulowana PMA,
- 10- : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 μM , niestymulowana PMA,
- 10+ : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10 μM , stymulowana PMA,
- 100- : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 μM , niestymulowana PMA,
- 100+ : próba badana o stężeniu $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 100 μM , stymulowana PMA.

Tabela 1. Schemat przygotowania prób kontrolnych i badanych

Table 1. Scheme of preparation of control and investigated samples

Próba	K-	K+	1-	1+	10-	10+	100-	100+
50 μl krwi	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5 ml wody destylowanej	+	+	-	-	-	-	-	-

2,5 ml Pb(CH ₃ COO) ₂ w stężeniu 1 µM	-	-	+	+	-	-	-	-
2,5 ml Pb(CH ₃ COO) ₂ w stężeniu 10 µM	-	-	-	-	+	+	-	-
2,5 ml Pb(CH ₃ COO) ₂ w stężeniu 1 µM	-	-	-	-	-	-	+	+
Inkubacja 60' w ciemności i temperaturze pokojowej								
25 µl 123 DHR	+	+	+	+	+	+	+	+
Inkubacja 5' w temperaturze 37°C								
2 µl PMA	-	+	-	+	-	+	-	+
Inkubacja 15' w ciemności i temperaturze pokojowej								
800 µl płynu lizującego	+	+	+	+	+	+	+	+
Inkubacja 15' w ciemności i temperaturze pokojowej								

Pomiaru dokonywano na cytometrze przepływowym FACScan (Becton Dickinson, USA) wyposażonym w laser argonowy (15 mW).

W próbach mierzono po 5000 neutrofilów. Pomiarowi podlegało światło rozproszone na komórkach oraz światło emitowane przez fluorochrom (123 rodaminę). Na podstawie pomiaru rozproszenia światła na komórkach zróżnicowano populacje leukocytów krwi obwodowej (limfocyty, monocyty i granulocyty). Do dalszej analizy wybrano neutrofile.

Pomiaru fluorescencji rodaminę 123 dokonywano w zakresie 515–548 nm (widmo zielone). Jako miary intensywności fluorescencji wybranych populacji komórek użyto wartości średniej arytmetycznej, wyliczonej przez program CellQuest.

Otrzymane wyniki poddano obróbce statystycznej za pomocą programu Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Zastosowano test Kolmogorowa-Smirnoffa oraz test t-Studenta do prób powiązanych, w którym wartość $p < 0,05$ była uważana za statystycznie istotną.

3. WYNIKI BADAŃ

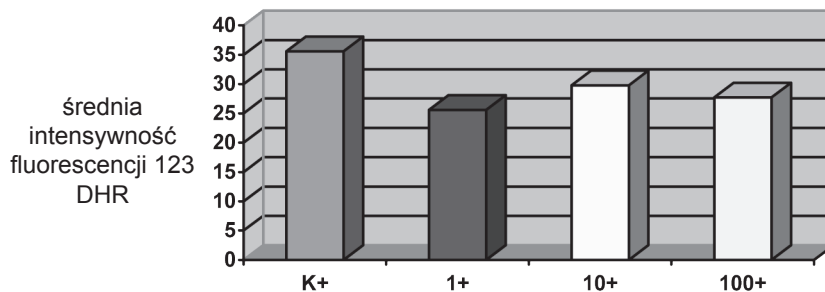
Poddanie próbek krwi działaniu soli ołowiu wywołało istotne statystycznie zmiany w produkcji reaktywnych form tlenu w granulocytach obojętnochłonnych stymulowanych PMA (tab. 2), przy stężeniu 1 µM i 100 µM Pb(CH₃COO)₂. W próbach niestymulowanych nie zaobserwowano istotności statystycznej.

Tabela 2. Porównanie produkcji RFT w neutrofilach stymulowanych PMA w próbach kontrolnych i badanych (kursywą zaznaczono wyniki świadczące o istotności statystycznej; oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Table 2. Comparison of RFT production in neutrophils stimulated with PMA in control and investigated samples (statistically significant results are marked in italic; samples are labeled according to the methodology)

Porównywane próby	Wartość p
K+ & 1+	<i>0,000432</i>
K+ & 10+	0,107496
K+ & 100+	<i>0,037866</i>

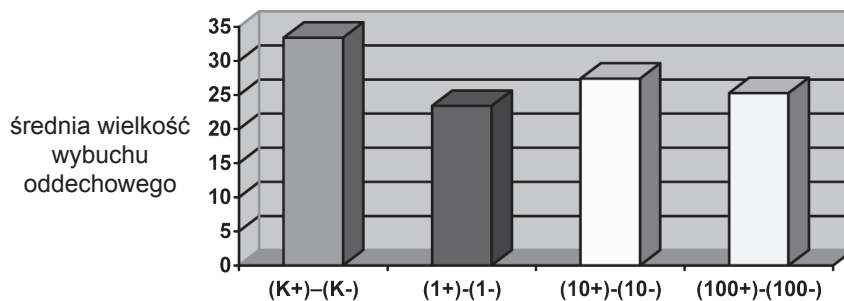
Średnia produkcja RFT (mierzona intensywnością fluorescencji 123 DHR) w próbach stymulowanych, poddanych działaniu octanu ołowiu, była niższa od średniej produkcji RFT w próbach stymulowanych, niepoddanych działaniu octanu ołowiu (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ octanu ołowiu (II) na produkcję RFT w granulocytach stymulowanych PMA (oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Fig. 1. Influence of lead acetate on RFT production in granulocytes stimulated with PMA (samples are labeled according to the methodology)

Średnia wielkość wybuchu oddechowego (czyli różnica w produkcji RFT w próbach stymulowanych PMA i spoczynkowych), w próbach poddanych działaniu octanu ołowiu (II), była niższa od średniej wartości wybuchu oddechowego w próbach kontrolnych (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ octanu ołowiu (II) na wybuch oddechowy granulocytów obojętnochłonnych (oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Fig. 2. Influence of lead acetate on respiratory burst of granulocytes (samples are labeled according the methodology)

Zaobserwowane różnice były istotne statystycznie przy stężeniu 1 μM i 100 μM $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (tab. 3). Stężenie 10 μM również powoduje spadek aktywności wybuchu, nie jest on jednak uznany za istotny w teście t – Studenta dla prób powiązanych.

Tabela 3. Porównanie wielkości wybuchu oddechowego w próbach poddanych działaniu octanu ołowiu (II) i w próbach kontrolnych (kursywą zaznaczono wyniki świadczące o istotności statystycznej, oznaczenia prób zgodne z podanymi w metodyce)

Table 3. Comparison of respiratory burst activity in samples incubated with lead acetate and in control samples (statistically significant results are marked in italic; samples are labeled according to the methodology)

Porównywane próby	Wartość p
<i>[(1+) – (1-)]&[(K+) – (K-)]</i>	<i>0,000392</i>
<i>[(10+) – (10-)]&[(K+) – (K-)]</i>	<i>0,095493</i>
<i>[(100+) – (100-)]&[(K+) – (K-)]</i>	<i>0,010654</i>

4. Dyskusja

Badania wykazały, że ołów w postaci octanu ołowiu (II) w stężeniach 1 μM oraz 100 μM wpływa redukująco na wybuch oddechowy neutrofilów krwi obwodowej człowieka *in vitro*.

Jako znacznika fluorescencyjnego do określenia aktywności wybuchu oddechowego użyto 123 dihydrorodaminy. Część badaczy zwraca uwagę na ograniczenia stwarzane przez tę substancję, takie jak powinowactwo, głównie do nadtlenu wodoru, czy wątpliwa korelacja oksydazy z kinetyką działania NADPH [Van Pelt 1996]. Badania wykazują jednak, że znacznik ten umożliwia wykonanie niezwykle czułych i dokładnych pomiarów [Richardson 1998], a nawet zdaje się być najczulszym indykatorem do detekcji wolnych rodników tlenowych w aktywowanych granulocytach [Vowells 1995].

Spotyka się wiele doniesień na temat wpływu ołowiu na organizm ludzki. Niektóre z nich dotyczą układu immunologicznego. U osób szczególnie narażonych na szkodliwe działanie ołowiu, takich jak pracownicy fabryk produkujących np. baterie ołowiowe, zauważyć można wiele nieprawidłowości ilościowych w zakresie układu odpornościowego. Należą do nich m.in.:

- spadek liczby limfocytów T – pomocniczych (Th),
- mniejszy niż u osób nienarażonych poziom immunoglobulin IgG oraz IgM,
- redukcja poziomu komponentu C3 i C4 dopełniacza.

Można zauważyć, że zmiany dotyczą zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej [Undeger 1996].

Zgoła inaczej przedstawia się kwestia wpływu ekspozycji na ołów, jeśli przyjrzeć się neutrofilom. Okazuje się, że poziomy granulocytów obojętnochłonnych u osób narażonych są istotnie wyższe niż u osób nienarażonych, w sposób liniowo zależny od dawki [Di Lorenzo 2006].

Jednocześnie ze wzrostem liczby neutrofilów, obserwuje się jednak ograniczenie ich funkcji, między innymi chemotaksji. Spotkać można również doniesienia o spadku aktywno-

ści fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych, oraz zmniejszeniu wewnątrzkomórkowej destrukcji patogenów, jest to jednak kwestia dyskusyjna [Di Lorenzo 2006; Undeger 1998].

W przeprowadzonych badaniach uzyskano wyniki świadczące o istotnym statystycznie redukującym wpływie soli ołowiu (II) w stężeniach $1\mu\text{M}$ oraz $10\mu\text{M}$ na wybuch oddechowy pobudzonych neutrofilów. Stężenie $10\mu\text{M}$ również obniżyło intensywność wybuchu, nie uzyskano jednak istotności statystycznej w teście t - Studenta dla prób powiązanych. Wyniki te zdają się być zgodne z doniesieniami Undegera i Basarana o hamującym wpływie ołowiu na wewnątrzkomórkową aktywność bójczą granulocytów obojętnochłonnych człowieka [Undeger 1998].

PIŚMIENICTWO

- DI LORENZO L., SILVESTRONI A., MARTINO M.G. et al. 2006. Evaluation of peripheral blood neutrophil leukocytes in lead – exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 79: 491–498.
- DING Y., GONICK H.C., VAZIRI N.D. 2000. Lead Promotes Hydroxyl Radical Generation and Lipid Peroxidation in Cultured Aortic Endothelial Cells. *AJH* 13: 552–555.
- GURER H., OZGUNES H., OZTEZCAN S., ERCAL N. 1999. Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol. Med.* 27: 75–81.
- JAKUBOWSKI M. 1993. Poziomy biologiczne ołowiu u mieszkańców Polski. *Med. Pr.* 6: 15–24.
- RICHARDSON M.P., AYLIFFE M.J., HELBERT M., DAVIES E.G. 1998. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods* 219: 187–193.
- STOHS S.J., BAGCHI D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol. Med.* 18: 321–336.
- TORRES M.A., DANGL J.L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 397–403.
- UNDEGER U., BASARAN N., CANPINAR H., KANSU E. 1996. Immune alterations in lead – exposed workers. *Toxicology* 109: 167–172.
- UNDEGER U., BASARAN N. 1998. Effects of lead on neutrophil functions in occupationally exposed workers. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 113–117.
- URBANEK-KARŁOWSKA B. 1993. Ocena pobrania ołowiu z produktów spożywczych. *Med. Pr.* 6: 43–49.
- VAN PELT L.J., VAN ZWIETEN R., WEENING R.S. et al. 1996. Limitations of the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J. Immunol. Methods* 191: 187–196.
- VAN EEDEN S.F., KLUT M.E., WALKER B.A.M., HOGG J.C. 1999. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Methods* 232: 23–43.

- VOWELLS S.J., SEKHSARIA S., MALECH H.L. et al. 1995. Flow cytometry analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods* 178: 89–97.
- ZIELIŃSKA A., IZDEBSKA-SZYMONA K. 2001. Immunotoksyczność ołowiu. *Problemy higieny* 71: 84–89.