

УДК 612.112:612.017.1:577.213/217:[615.324:597.552.51]

Н.Г. Плехова¹, Л.Н. Федянина², Л.М. Сомова¹, Н.Н. Беседнова¹, Т.К. Каленик²

¹НИИ микробиологии и эпидемиологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский государственный экономический университет (690091 г. Владивосток, Океанский пр-т, 19)

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ФАГОЦИТОВ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ МОЛОК ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

Ключевые слова: дезоксирибонуклеиновая кислота, нейтрофилы, макрофаги, ферменты.

Комплексное исследование состояния кислородзависимой системы фагоцитов крови выявило дозозависимое стимулирующее воздействие ДНК на эти клетки. Оно проявлялось в способности снижать активность ферментов, принимающих участие в образовании супероксидного анионного радикала и, напротив, повышать активность миелопероксидазы – катализатора преобразования аниона кислорода в перекись водорода. Все это позволяет сделать вывод, что ДНК молок лососевых обладает антиоксидантным эффектом в отношении фагоцитов крови. Кроме того, стимулирующее влияние этого вещества на другие функции фагоцитов (внутриклеточное содержание 5'-нуклеотидазы и катионных белков) может стать решающим фактором, определяющим перспективность применения ДНК молок лососевых рыб в качестве иммуностимулирующего средства, так как известно, что катионные белки являются представителями низкомолекулярных межклеточных регуляторов, участвующих в процессах сигнализации различных физиологических функций организма.

По основным биохимическим параметрам фагоциты крови – моноциты и нейтрофилы – не имеют принципиальных отличий от других клеток, однако характерной особенностью их метаболизма является способность под влиянием различных факторов экзогенного и эндогенного происхождения к мгновенной активации [1]. Нейтрофилы – короткоживущие, но многочисленные элементы, и им отведена главная роль в разрушении внеклеточных патогенов и их токсинов. Другая группа фагоцитов, производных от моноцитов, – макрофаги – относится к длительноживущим клеткам. В норме большинство нейтрофилов и моноцитов периферической крови находятся в состоянии покоя. Способность этих клеток к стимуляции систем отражает их «готовность» к осуществлению основных функций: бактерицидности, поглощению и перевариванию патогенов, что в дальнейшем обеспечивает антигенпредставляющие и иммунорегуляторные функции [1, 8].

Для фагоцитов при фаго-, пино- и экзоцитозе характерно постоянное потребление (интерьеризация) плазматической мембраны, которое компенсируется перманентным синтезом ее компонентов. Определение активности эктоферментов мембраны макрофагов, к которым относят аденозинтрифосфатазу и 5'-нуклеотидазу, позволяет оценить степень стимуляции этих клеток [14]. Также при стимуляции различными агентами в фагоцитах наблюдается активация

ферментных систем, резко возрастают поглощение кислорода, расход глюкозы, выделение углекислого газа и молочной кислоты, а цепь таких взаимосвязанных реакций получила название «дыхательного, или метаболического взрыва» [10, 12]. Комплексные исследования различных проявлений реактивности фагоцитирующих клеток, основанные как на количественном определении ферментативной активности, так и на оценке их способности к активации систем под влиянием специфического стимулятора, позволяет подойти к углубленной оценке роли этих клеток в защите организма.

Современные принципы биофармации базируются на оптимальном подборе состава и вида лекарственных форм, максимально эффективных с лечебной точки зрения при содержании в них минимума субстанций, обладающих побочными действиями [5]. Изучение «судьбы» лекарственных средств в организме – это первый этап исследования активности биологически активных веществ, который включает тестирование их свойств на моделях *in vitro*. К одной из таких моделей относятся клетки врожденного иммунитета – фагоцитирующие клетки крови (нейтрофилы и моноциты).

Цель настоящего исследования: охарактеризовать метаболическую активность фагоцитов крови после воздействия на них биологически активного вещества – ДНК из молок лососевых рыб.

Материалы и методы. В работе использовали ДНК из молок лососевых рыб, полученную учеными ТИНРО-центра г. Владивостока по оригинальной технологии [7]. Фракцию фагоцитирующих клеток, способных к адгезии, получали из гепаринизированной крови доноров [6]. Концентрацию клеток доводили до 2×10^6 в мл и клеточную суспензию разносили в пробирки Эпиндорфа. К взвеси клеток добавляли ДНК в концентрациях от 0,001 до 10 мг/мл. Контакт вещества с клетками составил 30, 90, 120, 150 и 180 мин. По истечении времени лейкоцитарная суспензия по 100 мкл вносилась в лунки плоскодонного планшета в триплетах для каждого образца. После 45 мин инкубации надосадок отбирался, а клеточный монослой трижды отмывался физиологическим раствором. Клетки высушивали на воздухе и фиксировали в парах формалина в течение 10 мин.

Определяли активность 5'-нуклеотидазы, для выявления активности кислородзависимой системы использовали гистохимический метод с нитросиним

Плехова Наталья Геннадьевна – канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-24-34; e-mail: pl_nat@hotmail.com.

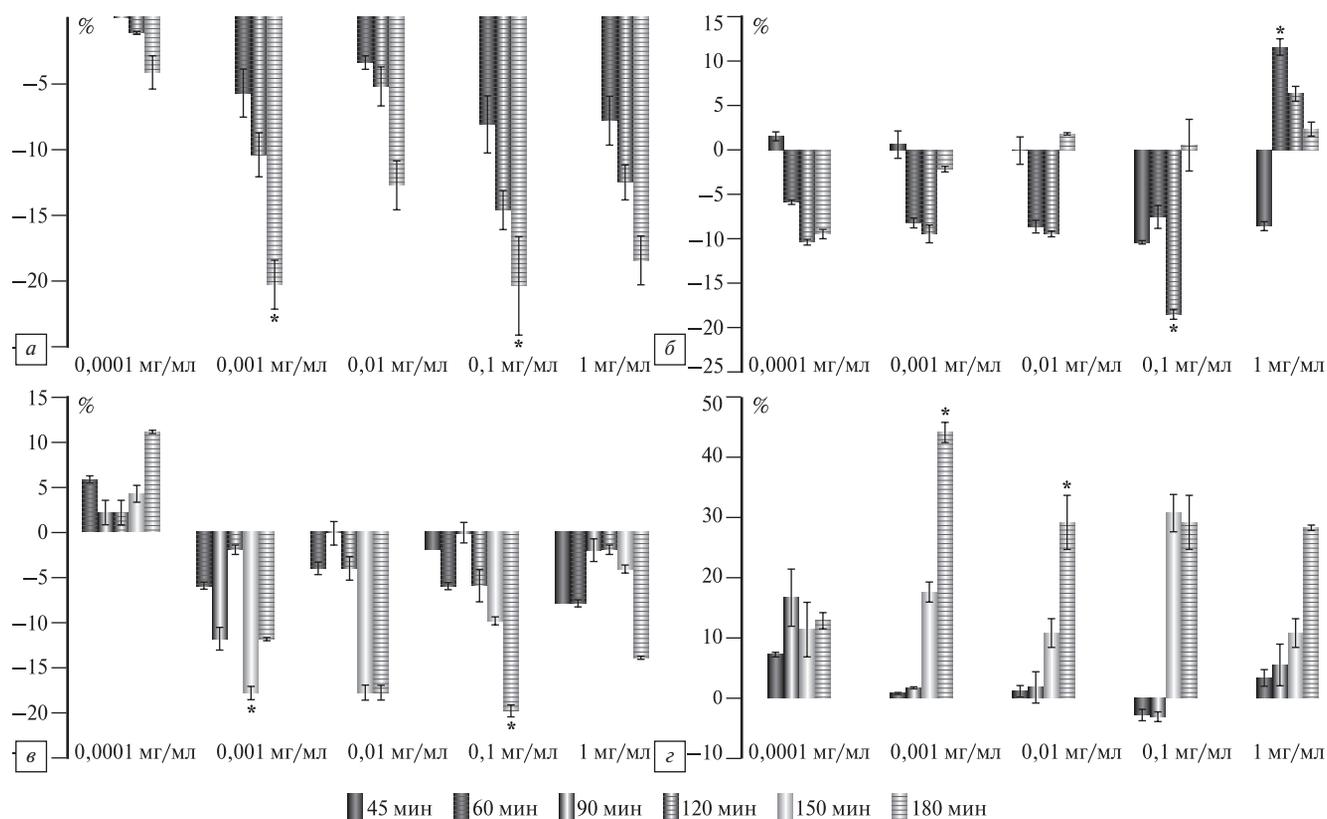


Рис. Активность ферментов фагоцитов крови при их взаимодействии с ДНК.

а – активность 5'-нуклеотидазы; *б* – НСТ-тест; *в* – активность лактатдегидрогеназы; *г* – активность миелопероксидазы. Ось ординат – индекс стимуляции *T*, ось абсцисс – количество внесенной ДНК («звездочкой» обозначена статистическая значимость различий между группами).

тетразолием – (НСТ-тест) и выявляли внутриклеточное содержание лактатдегидрогеназы и миелопероксидазы, а также катионных белков цитоплазматических гранул нейтрофилов [6]. НСТ-тест отражает степень активации кислородзависимого метаболизма фагоцитов – функции гексозомонофосфатного шунта и связанной с ним наработки свободных радикалов кислорода [10].

Результаты спектрофотометрического анализа активности ферментов выражали в виде унифицированного показателя – индекса стимуляции, который вычисляли по формуле:

$$T = (N_o - N_k) / N_k \times 100,$$

где *T* – индекс стимуляции (%), *N_k* – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в нестимулированных клетках; *N_o* – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в стимулированных клетках.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Одним из характерных признаков стимуляции фагоцитов является снижение внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидазы, что позволяет дифференцировать активированные и покоящиеся клетки [3, 14]. Добавление ДНК к монослою фагоцитов сопровождалось отчетливым снижением внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидазы (рис., а). Статистически значимые показатели отличались от контроля через 120 мин после внесения вещества в концен-

трации 0,001, 0,1 и 1 мг/мл (–10,4±1,8, –14,7±1,3 и –12,6±0,9% соответственно). Минимальные показатели зарегистрированы через 180 мин после контакта с ДНК (–20,3±1,7, –20,4±1,3 и –18,4±1,1% соответственно) и оставались на данном уровне до конца срока наблюдения. Таким образом, выявлена стимуляция фагоцитирующих клеток в ответ на введение ДНК в концентрациях 0,001, 0,1 и 1 мг/мл.

При исследовании фагоцитов было выявлено статистически значимое снижение показателей НСТ-теста при низких концентрациях вещества (0,0001, 0,001, 0,01 и 0,1 мг/мл) уже после 60 мин контакта (рис., б). Минимальные значения индекса стимуляции составили –10,4±0,9, –9,4±0,7, –9,4±0,8 и –18,5±1,3% соответственно через 120 мин контакта. Полученные данные указывают на регуляторное антиокислительное действие препарата ДНК на кислородзависимый метаболизм изученной популяции клеток.

Лактатдегидрогеназа принимает активное участие в начальном преобразовании углеводов, результатом которого является субстрат, используемый в образовании реактивных видов кислорода. Этот фермент относится к первому комплексу электронно-транспортной цепи и принимает участие в гидролизе [2]. В ответ на введение ДНК активность лактатдегидрогеназы в фагоцитах крови уменьшалась при всех концентрациях, кроме 0,0001 мг/мл (рис., в). Минимальные показатели при концентрации 0,001 и 0,01 мг/мл

Таблица

Внутриклеточное содержание катионных белков в фагоцитах после контакта с ДНК ($M \pm m$)

Концентрация ДНК, мг/мл	Индекс стимуляции после контакта, % ¹				
	через 45 мин	через 90 мин	через 120 мин	через 150 мин	через 180 мин
0,0001	100,00±2,15	162,60±1,80	52,00±2,20	145,00±8,90	0,51±0,45
0,001	98,98±5,14	167,50±1,90	45,40±5,10	165,00±2,15	31,02±4,23
0,01	103,60±4,66	172,96±2,26	78,60±4,66	139,80±8,98	6,50±1,67
0,1	124,00±4,98	156,50±2,26	65,30±4,64	128,60±4,64	9,20±0,47
1	174,50±1,50	139,80±3,60	69,40±2,15	187,70±2,15	5,10±2,60

¹ Разница с контролем (принят за 0) всех данных статистически значима.

были отрицательными и составили $-17,6 \pm 0,7\%$ через 150 мин и при добавлении ДНК в концентрациях 0,1 и 1 мг/мл – $-19,6 \pm 1,1$ и $13,7 \pm 1,2\%$ соответственно через 180 мин. Отчетливое уменьшение активности лактатдегидрогеназы в фагоцитах под воздействием препарата ДНК также подтверждает его антиоксидантное действие и указывает на снижение способности этих клеток к продукции реактивных форм кислорода.

Миелопероксидаза – железосодержащий протеин, являющийся катализатором преобразования перекиси водорода в гидроксильный радикал из гипохлорной кислоты и супероксидного аниона [10]. Было определено увеличение активности миелопероксидазы через 150 мин контакта фагоцитов с ДНК (рис., г). Максимальные показатели отмечались через 180 мин контакта при всех концентрациях: $12,89 \pm 0,7$, $44,38 \pm 3,4$, $29,4 \pm 1,7$, $30,9 \pm 2,1$ и $28,4 \pm 1,7\%$ соответственно. Так как миелопероксидаза принадлежит к системе защиты клеток от чрезмерного образования реактивных форм кислорода, то можно предположить, что ДНК молот лососевых рыб стимулирует данную систему фагоцитов.

Особенностью нейтрофилов является наличие в них обширного спектра молекул-эффекторов [9]. В последние два десятилетия отмечается новая тенденция в идентификации широкого массива структурно и функционально разнообразных полипептидов, которые способны выделять эти клетки [13]. Особый интерес вызывают неферментные бактерицидные белки с низкой молекулярной массой, которые обладают суммарным положительным зарядом и бактерицидным действием [11, 13]. Эти протеины способны играть роль медиатора воспаления, фактора проницаемости, стимулятора метаболических процессов и служить источником неспецифических опсонинных при фагоцитозе, модулируя свертывание крови и стимулируя зависимый от комплемента лизис, адгезию и хемотаксис [9, 13].

После контакта фагоцитов с ДНК определено резкое увеличение внутриклеточного содержания катионных белков после 45 мин экспозиции. Максимальные показатели отмечались через 90 мин. В конце срока наблюдения обнаруживалось снижение внутриклеточного содержания катионных белков до уровня интактных клеток, что можно объяснить их выделени-

ем фагоцитами во внеклеточное пространство (табл.). Полученные данные указывают на отчетливую стимуляцию ДНК синтетической активности фагоцитов.

Известно, что система фагоцитов, являясь звеном быстрого реагирования, играет важнейшую роль не только в антибактериальной, но и в противоопухолевой защите организма, а также в аллергических реакциях немедленной гиперчувствительности [9]. От функциональной полноценности данных клеток во многом зависит генез, течение и исход многих патологических состояний [4]. Помимо того, что реактивные формы кислорода, произведенные стимулированными фагоцитами, используются этими клетками для уничтожения поглощенных микроорганизмов, они могут вызывать множественное разрушение окружающих тканей, поэтому их образование должно быть отрегулированным [12]. При стимуляции фагоцитов на первом этапе происходит образование супероксидного анионного радикала путем передачи ему электрона от молекулярного кислорода, тогда как на втором этапе супероксидный анион преобразуется в следующий мощный окислительный компонент – перекись водорода [2, 10]. Комплексное исследование состояния кислородзависимой системы фагоцитов позволило выявить выраженное дозозависимое стимулирующее воздействие ДНК. Оно проявлялось в способности снижать активность ферментов, принимающих участие в образовании супероксидного анионного радикала, и, напротив, повышать активность миелопероксидазы – катализатора преобразования аниона кислорода в перекись водорода. Все это позволяет сделать вывод, что ДНК из молот лососевых обладает антиоксидантным эффектом в отношении фагоцитов крови. Кроме того, стимулирующее влияние исследуемого вещества на функцию фагоцитов может стать решающим фактором, определяющим перспективность применения ДНК в качестве иммуностимулирующего средства, в частности, для повышения естественной резистентности организма к возбудителям различных инфекционных заболеваний [3]. Этот факт подтверждают полученные нами данные о стимулирующем действии ДНК на способность фагоцитов выделять во внеклеточное пространство катионные белки, которые являются представителями низкомолекулярных межклеточных регуляторов, участвующих в процессах сигнализации различных физиологических функций организма.

Литература

1. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов // *Успехи совр. биол.* 1999. Т. 119, № 5. С. 462–475.
2. Кольман Я., Рем К.-Г. *Наглядная биохимия.* М.: Мир, 2000. 468 с.
3. Митькин В.В., Волков Н.И., Пшеничникова Т.Я., Сухих Т.Г. Действие даназола на активность 5'-нуклеотидазы перитонеальных макрофагов мышей // *Бюл. экп. биол. и мед.* 1992. № 2. С. 51–54.
4. Нестерова И.В. Вторичные иммунодефицитные состояния: справочник по иммунологии. СПб.: Диалог, 2002. 214 с.
5. Нестерова И.В., Сепиашвили Р.И. Иммунотропные препараты и современная иммунотерапия в клинической иммунологии и медицине // *Иммунология.* 2002. Т. 23, № 3. С. 132–138.
6. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма: методические рекомендации / Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Кондрашова Н.М., Запорожец Т.С. Владивосток: Полиграфкомбинат, 2005. 24 с.
7. Способ получения ДНК из молок рыб / Гаймула М.А., Кална В.Х., Микстайс У.Я., Эпштейн Л.М. Пат. СССР № 915446. Заяв. 10.10.1980; опубл. 01.07.1991 г.
8. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб: Наука, 2000. 232 с.
9. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С. и др. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // *Цитология.* 2007. Т. 49, № 12. С. 1000–1010.
10. Babior B. M. NADPH oxidase: an update // *Blood.* 1999. Vol. 93, No. 5. P. 1464–1476.
11. Ferencik M., Stefanovic J. Lysosomal enzymes of phagocytes and the mechanism of their release // *Folia microbial. Praha.* 1999. Vol. 24, No. 6. P. 503–575.
12. Forman H.J., Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling (Respiratory burst in macrophage signaling) // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166. P. S4–S8.

13. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes // *J. Leukocyte Biology.* 2004. Vol. 74. P. 909–925.
14. Livescu A., Manda G., Constantin C. et al. Plasma membrane potential interferes with the respiratory burst of peripheral granulocytes // *J. Cell. Mol. Med.* 2003. Vol. 7, No. 1. P. 73–78.

Поступила в редакцию 13.04.2009.

CHANGING METABOLISM OF PHAGOCYTES IN BLOOD IN RESPONSE TO ACTION OF SALMON MILT-DERIVED DEOXYRIBONUCLEIC ACID

N.G. Plekhova¹, L.N. Fedyanina², L.M. Somova¹, N.N. Besednova¹, T.K. Kalenik²

¹ Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ² Pacific State University of Economics (19 Okeanskiy Av. Vladivostok 690091 Russia)

Summary – The paper provides an integrated study into the state of oxygen-dependent systems of phagocytes in blood. As shown, there was a dose-dependent stimulating effect produced by DNA on these cells that appeared to have capability of decreasing activity of ferments that participated in generation of superoxide anionic radical and, in contrast, increasing activity of myeloperoxidase being a catalyst of oxygen anion conversion into hydrogen peroxide. This allowed to consider the salmon milt DNA to have antioxidative effect with respect to hemato-phages. Besides, stimulatory effects of this substance on other phagocyte functions (intracellular contents of 5'-nucleotidases and cationic proteins) could be determinative for prospects of applying the salmon milt-derived DNA as immune-response stimulating drug because the cationic proteins have been known to be representatives of low-molecular intracellular regulators very likely to participate in signalling various physiological functions of an organism.

Key words: deoxyribonucleic acid, neutrophils, macrophages, ferments.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 52–55.

УДК 611.61:546.815:[615.324:593.95]-092.9

Е.Ю. Приезжева¹, О.А. Лебедько¹, Б.Я. Рыжавский², В.К. Козлов¹

¹ Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства (680022 г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49, корп. 1), ² Дальневосточный государственный медицинский университет (680000 г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35)

ВЛИЯНИЕ ЭХИНОХРОМА А НА СТРУКТУРУ И МЕТАБОЛИЗМ ПОЧЕК 40-СУТОЧНЫХ БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИТРАТА СВИНЦА

Ключевые слова: свинец, морфология почек, свободнорадикальное окисление.

На модели 40-суточных белых крыс, подвергшихся пренатальному воздействию нитрата свинца, изучено влияние эхинохрома А на морфологию и функциональные показатели почек. Определялись показатели свободно-радикального окисления в гомогенатах почек и сыворотке крови. Нитрат свинца индуцировал оксидативный стресс и деструктивные изменения в почках. Эхинохром А предотвращал формирование этих нарушений.

Соли тяжелых металлов, и прежде всего свинца, являются наиболее распространенными антропогенными токсикантами [9]. К действию ксенобиотиков

организм особо чувствителен на ранних этапах онтогенеза. При этом почки, как главная экскреторная структура, являются органом-мишенью [8]. Ранее на собственной экспериментальной модели отсроченного внешнесредового дизэмбриогенетического эффекта нитрата свинца было выявлено участие свободных радикалов в патогенезе деструктивных изменений в почках, что было обусловлено пренатальным воздействием данного экотоксиканта [5].

Эхинохром А (2,3,5,7,8-пентагидрокси-6-этилнафталиндион-1,4), выделенный из основного пигмента панцирей морских ежей, обладает мембраностабилизирующими, противовоспалительными, иммуномодулирующими свойствами, в основе которых лежит выраженный антиоксидантный антирадикальный

Лебедько Ольга Антоновна – д-р мед. наук, в.н.с., заведующая клинико-диагностической лабораторией НИИ охраны материнства и детства Хабаровского филиала ДНЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН; тел.: 8 (4212) 35-65-91; e-mail: iomid@yandex.ru.