

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК

Л. Э. Веснина, Т. В. Мамонтова, М. В. Микитюк, Н. Л. Куценко, Л. А. Куценко, Н. А. Боброва, Л. В. Беркало, И. П. Кайдашев¹

Изучено влияние водной дисперсии фуллерена C₆₀ на функциональную активность клеток, участвующих в реакциях фагоцитоза. Фуллерен C₆₀ (FC₆₀) (0,01 и 0,1 мМ/л) оказывал преимущественно негативное воздействие на активность клеток неспецифического звена иммунитета, подавляя ферментативную активность миелопероксидазы и уровень индуцированной хемилюминесценции, экспрессию молекул CD54, участвующих в адгезии за исключением незначительного стимулирующего влияния на показатели НСТ-теста. Результаты свидетельствуют о влиянии фуллерена C₆₀ на различные этапы и механизмы фагоцитоза, показывают целесообразность дальнейших более детальных исследований в этом направлении с целью воздействия на определенные механизмы иммунной защиты.

Ключевые слова: наночастицы, фуллерен C₆₀, фагоцитоз, нейтрофилы, моноциты, лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Развитие технологий и активный научный поиск способствуют появлению новых средств целенаправленного адресного воздействия на клетки-мишени. Одними из наиболее перспективных претендентов в этом направлении стали наночастицы — фуллерены, принадлежащие к классу аллотропных углеродов. Сегодня наиболее изучен фуллерен C₆₀ (FC₆₀), который, благодаря способности к взаимодействию с клетками и биологическими молекулами проявляет антивирусные, антибактериальные, антиоксидантные и цитопротекторные свойства, влияет на апоптоз [4, 16].

В последние годы появились данные, что FC₆₀ может подавлять развитие воспалительных процессов, вызванных оксидативным стрессом за счет активации фагоцитарных реакций. Введение FC₆₀ вызывает адгезию и миграцию нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления с последующим обнаружением его в фаголизосомах клеток [13]. При этом FC₆₀ блокирует синтез провоспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8, последний из которых является ключевым хемоаттрактантом для нейтрофилов [5].

В результате воздействия FC₆₀ обнаружен провоспалительный прооксидантный эффект за счет стимуляции эндотелиальных клеток с усилением экспрессии хемокинов и селектинов — хемоаттрактанта моноцитов MCP-1, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, адгезивных молекул сосудистых клеток VCAM-1 и

E-селектина, повышением активности нейтрофилов и некроза [7, 9]. Эти данные свидетельствуют о неоднозначном влиянии FC₆₀ на клетки и необходимости детального изучения его свойств. Поэтому целью настоящей работы стало исследование влияния водной дисперсии FC₆₀ на активность клеток, участвующих в реакциях фагоцитоза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали периферическую кровь 10 практически здоровых доноров обоего пола возрастом 28 – 45 лет, полученную из локтевой вены в пробирки с гепарином (“Vacutainer Systems”, Великобритания). У пациентов получили письменное согласие на обследование, все манипуляции проводили с разрешения комиссии по биоэтике Украинской медицинской стоматологической академии.

Водную дисперсию FC₆₀ получали путем перемешивания FC₆₀ (Sigma, США) с деионизированной водой на магнитной мешалке в течение 2-х месяцев [3]. Клетки цельной крови в объеме 1 мл инкубировали с водной дисперсией FC₆₀ в конечной концентрации 0,01 и 0,1 мМ/л в течение 10 мин при 37 °С. Дозы препарата подбирались с учетом отсутствия критических деструктивных воздействий на витальные параметры клеток [19].

Экспрессию молекул межклеточной адгезии CD54 (ICAM-1) определяли на клетках цельной крови. Кровь инкубировали с моноклональными антителами LT54 к молекулам CD54 и с анти-F(ab)2-антителами, меченными флюоресцеинизотиоцианатом (Сорбент, Россия). Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор (“Caltag”, США). Флюоресценцию

¹ НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики, Украинская медицинская стоматологическая академия, Украина, Полтава, 36024, ул. Шевченко, 23

регистрировали в реакции непрямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлюориметре EPIC LX-MCL (“Beckman Coulter”, США) с помощью программы System ITM software [2].

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по фагоцитарному показателю (процент фагоцитирующих клеток) в тесте с монодисперсными частицами латекса (ДиаМ, Россия) [10].

Состояние кислородзависимых механизмов нейтрофилов определяли в тесте с нитросиним тетразолием — НСТ (ДиаМ, Россия). Учет реакции проводили по степени интенсивности специфической окраски, рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК), выражали в условных единицах (усл. ед.) [10]. Активность миелопероксидазы определяли по окислению хромогена (бензидина) по методу Грэхема-Кнолля, рассчитывали СЦК и результат выражали в усл. ед. [10].

Продукцию активных форм кислорода определяли по люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [1]. Максимальную интенсивность свечения регистрировали последовательно в течение 10 мин, при которых происходила стабилизация ее интенсивности при 37 °С (спонтанная ХЛ). Респираторный взрыв клеток активировали добавлением 100 мкл 0,1 % суспензии зимозана (НПО “Биолар”, Латвия) и определяли стимулированную ХЛ. Измерения проводили на биолюцинометре БХЛ-06 (Нижний Новгород, Россия), результаты представляли в имп/сек.

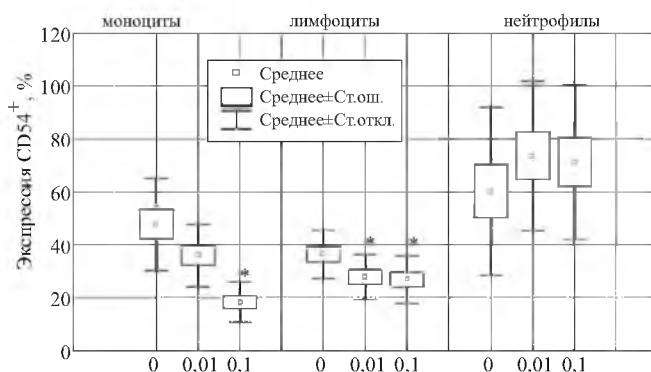
Содержание лизосомальных катионных белков (ЛКБ) определяли в эозинофилах, рассчитывали СЦК и выражали в усл. ед. [10].

Статистическую обработку проводили при помощи программы Statistica 6.0 (StatSoft, США) с вычислением среднего (M) и среднеквадратического отклонения (m). Достоверность различий определяли в t-тесте Стьюдента для попарно связанных величин и непараметрическом тесте Уилкоксона, взаимосвязь показателей определяли корреляционным анализом Пирсона. Статистически значимыми результаты считали при $p < 0,05$.

Влияние фуллера C₆₀ на показатели функциональной активности нейтрофилов и эозинофилов

| Показатель | Контроль (n = 10) | Доза фуллера C ₆₀ , мМ/л | | |
|---|-------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|
| | | 0,01 (n = 10) | 0,1 (n = 10) | |
| Фагоцитоз в нейтрофилах, % | 35,6 ± 2,61 | 34,6 ± 1,8 | 33,8 ± 2,67 | |
| Миелопероксидаза в нейтрофилах, усл. ед. | 1,55 ± 0,12 | 1,27 ± 0,1* | 1,31 ± 0,13 | |
| НСТ-тест в нейтрофилах, усл. ед. | 1,64 ± 0,12 | 1,87 ± 0,9* | 1,67 ± 0,11 | |
| Хемилюминесценция, имп/с | Спонтанная | 17062,6 ± 4464,9 | 15845,4 ± 947,9 | 13222,9 ± 2969,1 |
| | Индукцированная | 44020,5 ± 4698,7 | 17004,5 ± 2641,6* | 34371,2 ± 3124,5*.# |
| Лизосомальные катионные белки в эозинофилах, усл. ед. | 2,19 ± 0,06 | 2,17 ± 0,07 | 2,18 ± 0,06 | |

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной серией. # — $p < 0,05$ по сравнению с серией после воздействия фуллера в дозе 0,01 мМ/л.



Влияние фуллера C₆₀ на уровень экспрессии CD54.

По оси абсцисс — концентрация фуллера C₆₀, мМ/л; по оси ординат — процент клеток экспрессирующих CD54. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной серией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования изучено изменение уровня экспрессии молекул CD54 на моноцитах, лимфоцитах и нейтрофилах под влиянием FC₆₀ (рисунок). На моноцитах экспрессия CD54 достоверно снижалась под влиянием FC₆₀ в дозе 0,1 мМ/л, на лимфоцитах — при использовании FC₆₀ в обеих дозах. На нейтрофилах достоверных изменений уровня экспрессии CD54 не наблюдалось.

Фагоцитарная активность нейтрофилов достоверно не изменялась при использовании FC₆₀ в обеих дозах (таблица). Использование FC₆₀ в дозе 0,01 мМ/л способствовало достоверному повышению показателей кислород-стимулирующей активности нейтрофилов в НСТ-тесте и достоверному снижению активности миелопероксидазы в нейтрофилах (таблица). Не отмечено достоверного воздействия дозы 0,1 мМ/л.

При оценке способности клеток генерировать активные формы кислорода под воздействием FC₆₀ наблюдали снижение уровня индуцированной ХЛ по сравнению с контролем в 2,6 раза ($p < 0,05$) и в 1,3 раза ($p < 0,05$) под влиянием FC₆₀ в дозах 0,01 мМ/л и 0,1 мМ/л соответственно (таблица). Достоверных изменений продукции ЛКБ в эозинофилах под воздействием FC₆₀ не обнаружено (таблица).

Корреляционный анализ показал наличие прямой зависимости между уровнями активности миелопероксидазы и индуцированной ХЛ на фоне действия FC_{60} в дозе $0,1 \mu M/l$ ($r = 0,708$, $p < 0,05$), уровнем экспрессии CD54 на контрольных лимфоцитах и уровнем экспрессии CD54 на лимфоцитах на фоне действия FC_{60} в дозе $0,01 \mu M/l$ ($r = 0,878$, $p < 0,05$) и $0,1 \mu M/l$ ($r = 0,910$, $p < 0,05$). Обратная зависимость установлена между показателями уровня экспрессии CD54 на лимфоцитах и уровнем индуцированной ХЛ под действием FC_{60} в дозе $0,01 \mu M/l$ ($r = -0,684$, $p < 0,05$).

Реакции неспецифического иммунитета играют ключевую роль в реализации воспаления. Фагоциты, в частности, гранулоциты и макрофаги, в ответ на хемотаксические факторы способны чрезвычайно быстро мигрировать через сосудистую стенку и накапливаться в воспалительном очаге. Началом фагоцитоза является распознавание и связывание фагоцитом молекулы или клетки, окружение ее псевдоподиями. В дальнейшем идет внутриклеточное преобразование в рециклирующей эндосоме, ранней и поздней эндосоме и окончательная деградация в лизосоме [6]. Мы оценивали влияние фуллерена C_{60} на определенные моменты этого многостадийного процесса.

В процессе миграции и адгезии на поверхности моноцитов, лимфоцитов и эндотелиальных клеток появляются молекулы межклеточной адгезии CD54 [11], которые играют важную роль в эндотелиальной миграции лейкоцитов в место воспаления, обеспечивают взаимодействие антигенпрезентирующих клеток с Т-лимфоцитами. Установлено, что FC_{60} вызывает одностороннее снижение экспрессии CD54 на лимфоцитах и моноцитах, что ограничивает их возможное участие в вышеперечисленных реакциях, не оказывая достоверного влияния на уровень экспрессии CD54 на нейтрофилах. Известно, что подобно моноцитам, нейтрофилы с помощью молекулы CD54 могут связываться с лигандом на клетках сосудистого эндотелия и покидать кровяной ток. Показано, что ингаляция FC_{60} вызывает незначительную миграцию нейтрофилов из периферической крови в легкие, где большая часть фуллерена фагоцитируется макрофагами [13]. Согласно другим данным, наночастицы способны оказывать воздействие на уровень готовности нейтрофилов к хемотаксису и последующей адгезии, в частности, увеличивая экспрессию молекул цитокин-индуцированного нейтрофильного хемоаттрактанта CINC на нейтрофилах легких [15]. В целом наши данные свидетельствуют о негативном влиянии FC_{60} на экспрессию молекул адгезии лимфоцитов и моноцитов.

Исследование активности самого этапа фагоцитоза показало отсутствие достоверного влияния FC_{60} , что согласуется с результатами работы [17]. Авторы показали, что водная дисперсия производных FC_{60} в нейтрофилах стимулирует бактерицидную активность, повышает выживание, но не влияет на фагоцитоз.

По нашему мнению, причина такого негативного воздействия фуллерена на процесс фагоцитоза лежит в

механизмах его взаимодействия с клеточной мембраной. Использование метода молекулярной динамики показало, что проникновение FC_{60} в мембрану происходит в течение несколько наносекунд [18]. По данным авторов, FC_{60} способен оставаться внутри мембраны длительное время, влияя на ее свойства: диффузию липидов, толщину, форму. Так, при молярной концентрации фуллерена $11,1 \%$ коэффициент диффузии липидов понижается на 40% , модуль сжатия мембраны — на 10% и модуль изгиба — на 20% , что в целом свидетельствует об общем смягчении мембраны, но без видимых повреждений [18]. По всей видимости, в дальнейшем такие изменения липидного бислоя приводят к нарушению функций клетки.

Интересные данные получены на макрофагах, когда ультрадисперсные частицы сажи способствовали нарушению фагосомного транспорта и приводили к дисфункциям цитоскелета с транзиторным повышением уровня внутриклеточного кальция [12]. По предположению авторов, важную роль в этом воздействии играет удельная площадь поверхности частиц. Учитывая совокупную площадь поглощаемых макрофагами частиц, авторы работы [14] предположили, что наночастицы пересекают клеточную мембрану не-эндоцитозным механизмом. Субклеточное представительство для различных типов частиц может быть различным — эндолизосомальное, цитоплазматическое, ядерное, митохондриальное, что безусловно может затрагивать и функции клетки.

Поглощение микроорганизмов путем фагоцитоза вызывает в течение нескольких секунд стимуляцию дыхательных процессов и появление реактивных оксидантов — токсических кислородных соединений и окисленных галогенов. Восстановление НСТ в фагоците напрямую зависит от эффективности метаболических путей, в которых нарабатывается супероксид и его производные с выраженными антимикробными свойствами. Согласно результатам, FC_{60} в дозе $0,01 \mu M/l$ стимулировал показатели НСТ-теста в нейтрофилах, что свидетельствует о его способности оказывать бактерицидное воздействие на клетки путем активации продукции активных метаболитов кислорода и согласуется с данными [9] о стимуляции продукции активных форм кислорода под воздействием поглощенного фуллерена через 10 мин после начала воздействия.

В нейтрофилах процесс кислородзависимого фагоцитоза сопровождается активной секрецией фермента миелопероксидазы, которая катализирует развитие токсического воздействия перекиси водорода на различные микроорганизмы. Нами установлено, что FC_{60} в дозе $0,01 \mu M/l$ ингибирует активность миелопероксидазы в нейтрофилах.

Одним из важных моментов фагоцитоза является выработка высококислородных метаболитов и активация гексозомонофосфатного пути окисления. Оценка данных параметров методом ХЛ показала ингибирование показателей индуцированной ХЛ под влиянием

FC₆₀. Выявленная положительная корреляционная взаимосвязь между уровнем активности миелопероксидазы и уровнем индуцированной ХЛ при использовании FC₆₀ в дозе 0,1 мМ/л подтверждается данными, что индукция ХЛ связана с взаимодействием с высокореактивными метаболитами кислорода (синглетный кислород или перекись водорода) под воздействием миелопероксидазы. Это указывает на возможную способность FC₆₀ ослаблять кислородзависимые механизмы в нейтрофилах и моноцитах.

Кислороднезависимый механизм реализации фагоцитоза сопровождается выработкой клетками гидролитических ферментов – протеиназ, катионных белков и лизоцима. Выделяемые эозинофилами продукты способствуют фагоцитозу, лизису и уничтожению поглощенных агентов, подавляют воспалительную реакцию, в частности, миграцию гранулоцитов в очаг инвазии [8]. Достоверное влияние FC₆₀ на показатели ЛКБ в эозинофилах в нашем исследовании не обнаружено.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о влиянии FC₆₀ на различные этапы и механизмы реакции фагоцитоза. В целом, FC₆₀ оказывает преимущественно негативное воздействие на активность клеточного неспецифического звена иммунитета, что, по всей видимости, можно объяснить особенностями взаимодействия исследуемого вещества с клеточной мембраной и его последующим нахождением внутри клетки, что приводит в конечном итоге к изменению ее функций. Результаты работы указывают на целесообразность дальнейших более детальных исследований в этом направлении и свидетельствуют о потенциальной возможности применения FC₆₀ в медицинской практике как средства воздействия на определенные механизмы иммунной защиты.

ВЫВОДЫ

1. FC₆₀ в дозе 0,01 мМ/л вызывает снижение экспрессии CD54 на лимфоцитах и моноцитах, подавляет ферментативную активность миелопероксидазы, снижает уровень индуцированной хемилюминесценции в обеих дозах, не оказывает достоверного влияния на активность фагоцитоза.

2. FC₆₀ в дозе 0,01 мМ/л повышает показатели НСТ-теста в нейтрофилах.

Работа является фрагментом научно-исследовательской работы, финансируемой Министерством здравоохранения Украины, № 0109U001628 “Разработка методов иммуномодуляции с использованием наночастиц”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Е. Митерева, В. Е. Агафонов, *Клин. лаб. диагностика*, № 3, 47 – 50 (2004).
2. Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин, Д. В. Мазуров и др., *Журн. микробиол.*, № 6, 105 – 111 (2002).
3. A. Dhavan, J. S. Taurozzi, A. K. Pandey, et al., *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 7394 – 7401 (2006).
4. R. A. Freitas, Jr *Nanomedicine*, vol. I, Landes Bioscience, Austin, Texas (1999).
5. J. Gao, H.-L. Wang, R. Iyer, *J. Nanomaterials*, 2010, 1 – 9 (2010).
6. A. Haas, *Traffic*, **8**, 311 – 330 (2007).
7. W. Hee Lee, P. H. Kim, Y. W. Lee, *J. Immunology*, **182**, 93 – 99 (2009).
8. S. P. Hogan, H. F. Rosenberg, R. Moqbel, et al., *Clin. Exp. Allergy*, **38**, 709 – 750 (2008).
9. A. Isakovic, Z. Markovic, B. Todorovic-Markovic, et al., *Toxicol. Sci.*, **91**(1), 173 – 183 (2006).
10. І. П. Кайдашев (ред.), *Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині*, Полімет, Полтава (2003).
11. C. Lawson, S. Wolf, *Pharmacological Reports*, **61**, 22 – 32 (2009).
12. W. Moller, D. M. Brown, W. G. Kreyling, V. Stone, *Part. Fibre Toxicol.*, **4**, 2 – 7 (2005).
13. Y. Morimoto, M. Hirohashi, A. Ogami, et al., *Part. Fibre Toxicol.*, **7**, 1 – 4 (2010).
14. O. R. Moss, V. A. Wong, *Inhal. Toxicol.*, **18**(10), 711 – 716 (2006).
15. K. Nishi, Y. Morimoto, A. Ogami, et al., *Inhal. Toxicol.*, **21**(12), 1030 – 1039 (2009).
16. M. Saton, I. Takayanagi, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 513 – 518 (2006).
17. N. Tsao, T.-Y. Luh, C.-K. Chou, et al., *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **45**(6), 1788 – 1793 (2001).
18. J. Wong-Ekkabut, S. Baoukina, W. Triampo, et al., *Nat. Nano.*, **3**(6), 363 – 368 (2008).
19. A. Xu, Y. Chai, T. Nohmi, T. K. Hei, *Part. Fibre Toxicol.*, **6**, 1 – 13 (2009).

Поступила 21.09.10

EFFECT OF FULLERENE C₆₀ ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHAGOCYTOTIC CELLS

L. E. Vesnina, T. V. Mamontova, M. V. Mikityuk, N. L. Kutsenko, L. A. Kutsenko, N. A. Bobrova, L. V. Berkalo, and I. P. Kaidashev

Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology Development and Pharmacogenetics, Ukrainian Medical Stomatological Academy, ul. Shevchenko 23, 36024 Poltava, Ukraine

The effect of aqueous dispersion of fullerene C₆₀ (FC₆₀) on the functional activity of cells involved in the phagocytosis reactions was studied. FC₆₀ (0.01 μM/l and 0.1 μM/l) produced mainly negative effects on the activity of nonspecific immunity cells by inhibiting the myeloperoxidase enzymatic activity, decreased the level of induced chemiluminescence, and suppressed the expression of molecules CD54 involved in the adhesion. The only exception was a slight stimulating effect on the NBT test. The results indicate the FC₆₀ influences various stages and mechanisms of phagocytosis.

Key words: Nanoparticles, fullerene C₆₀, phagocytosis, neutrophils, monocytes, lymphocytes