

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

*Н.Г. Плехова<sup>1</sup>, Л.Н. Федянина<sup>2</sup>, Л.М. Сомова<sup>1</sup>, Н.Н. Беседнова<sup>1</sup>, Т.К. Каленик<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>НИИ микробиологии и эпидемиологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), <sup>2</sup>Тихоокеанский 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  $2 \times 10^6$  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.

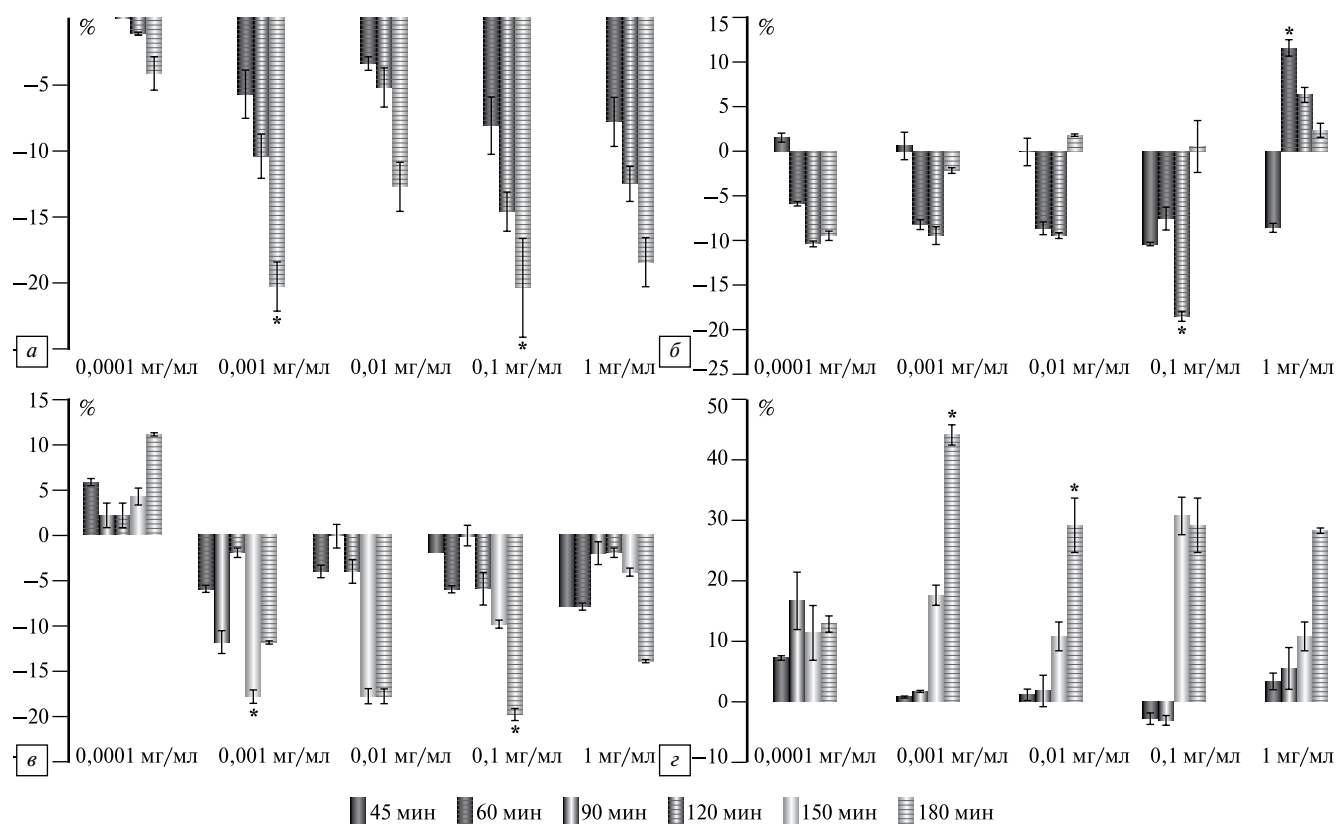


Рис. Активность ферментов фагоцитов крови при их взаимодействии с ДНК.

а – активность 5'-нуклеотидазы; б – НСТ-тест; в – активность лактатдегидрогеназы; з – активность миелопероксидазы. Ось ординат – индекс стимуляции Т, 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 Т – 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 ( $-10,4 \pm 1,8$ ,  $-14,7 \pm 1,3$  и  $-12,6 \pm 0,9\%$  соответственно). Минимальные показатели зарегистрированы через 180 мин после контакта с ДНК ( $-20,3 \pm 1,7$ ,  $-20,4 \pm 1,3$  и  $-18,4 \pm 1,1\%$  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  $-10,4 \pm 0,9$ ,  $-9,4 \pm 0,7$ ,  $-9,4 \pm 0,8$  и  $-18,5 \pm 1,3\%$  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, % <sup>1</sup>				
	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

<sup>1</sup> 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 опсонинов 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.