

УДК 57.086.833: 576.121: 577.15

©Коллектив авторов

## **МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ОРГАНИЗМА С ИНОРОДНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ**

***Н.Г. Плехова\*, Л.М. Сомова, В.И. Пуздаев, Е.И. Дробот***

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН,  
690087 Владивосток, ул. Сельская, 1; тел.: (4232) 442-434; факс: (4232) 441-147;  
эл. почта: pl\_nat@hotmail.com

В стимулированном состоянии нейтрофилы и моноциты крови в ответ на воздействие инородных материалов способны выделять биологически активные вещества, которые оказывают влияние на репаративные процессы. В основу предлагаемой в настоящем исследовании модели изучения биосовместимости организма с инородными материалами положено существенное изменение активности фагоцитирующих клеток крови в ответ на внесение стимулирующих агентов. На примере воздействия различных инородных материалов (керамика, титан, латекс, хирургическая сталь и медь), из которых могут быть изготовлены имплантаты и хирургические инструменты, показано, что лейкоциты показывают различную реакцию ферментных систем. Данная модель позволяет комплексно и объективно оценить степень влияния инородных веществ на нейтрофилы и макрофаги – эффекторные клетки воспалительного процесса. Причем, наиболее выраженными показателями является активность катионных белков и ферментов плазматических мембран этих клеток.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, моноциты, ферменты, биосовместимость, инородные материалы

**ВВЕДЕНИЕ.** Внедрение любых чужеродных агентов в организм сопровождается его ответной реакцией, поэтому необходимым свойством инородного материала, используемого для имплантации, должна быть его инертность в отношении живых систем, т.е. способность вызывать минимальные защитно-приспособительные реакции организма. Тем не менее, каким бы высоким уровнем биосовместимости не обладал инородный материал, его присутствие, даже кратковременное, вызывает воспалительную реакцию живой ткани, которое возникает в ответ на нарушение гомеостаза организма. Таким образом, исследование процесса взаимодействия с живыми системами инородных материалов, а также компонентов их составляющих, необходимо проводить по совокупности защитной реакции организма с его воспалительным ответом. Известно, что к эффекторам экссудативно-деструктивного воспаления относятся специализированные лейкоцитарные клетки – нейтрофилы [1]. Эффекторная роль этих клеток определяется их чрезвычайно высоким флогогенным потенциалом, связанным с гиперпродукцией и гиперсекрецией лизосомальных гидролаз,

---

\* - адресат для переписки

простагландинов, лейкотриенов, оксидантов, обуславливающих повреждение эндотелия сосудов, расстройства микроциркуляции и деструкцию матрикса соединительной ткани в зоне повреждения. В этом плане с нейтрофилами сопоставимы моноциты, но флогогенный заряд этих клеток не обладает такой мощной мгновенной реакционностью [2].

Исследования биосовместимости живых систем с инородными материалами *in vitro*, в основном, проводились на модели моноцитов. Так, изучалась продукция цитокинов этими клетками в ответ на внедрение имплантантов, изготовленных из керамики, и было установлено, что их внедрение вызывает низкий уровень экскреции этих биологически активных веществ [3]. При тестировании различных образцов керамики было выявлено, что синтетический апатит вызывал наименьшую хемотаксическую активность макрофагов, а ультраструктурный анализ этих клеток показал, что они не активируются в присутствии как синтетического, так и природного апатита [4]. При исследовании действия метакрилового порошка на моноциты определено его ингибирующее воздействие на кислородзависимый метаболизм клеток [5]. В случае нейтрофилов предлагается определять внутриклеточное содержание лактатдегидрогеназы и продукции фактора некроза опухоли в качестве дополнительного теста для определения биосовместимости композитов, используемых в хирургии [6]. Предлагаемые методы и модели определения биосовместимости живых систем с инородными материалами позволяют оценить воздействие этих материалов на отдельные клеточные элементы крови по ограниченному спектру параметров, что не дает возможность комплексно оценить реакцию этих клеток на внедрение подобных материалов и выразить степень такого воздействия в цифровых значениях. На наш взгляд, такую возможность может предоставить культура фагоцитирующих клеток, которая включает популяцию нейтрофилов и моноцитов/макрофагов.

По современным представлениям [7], существуют два отчетливо различимых функциональных состояния фагоцитов: исходное, так называемое “redox”, с низким уровнем протекания метаболических процессов, и активированное, переход в которое обусловлен взаимодействием клеток с различными стимуляторами. При этом в процессе предварительного воздействия стимулов отмечается увеличение функционального потенциала нейтрофилов и макрофагов – усиление миграции, адгезии, дегрануляции и уровня метаболизма, а также параллельно активируются две функции фагоцитов: выброс содержимого гранул в фагосому и “кислородный взрыв”. В подобном состоянии фагоциты, выделяя различные биологически активные вещества, способны вызывать к месту внедрения инородного материала приток других клеток, которые, в свою очередь, оказывают влияние на последующие репаративные процессы. При исследовании активности ферментных систем нейтрофилов и моноцитов/макрофагов с помощью инструментального (спектрофотометрического) объективного подсчета данных можно оценить степень ответной реакции этих клеток на внедрение инородного материала.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования явилось изучение в системе *in vitro* метаболизма нейтрофилов и макрофагов в ответ на введение различных инородных материалов и на этой основе обоснование модели для исследования биосовместимости организма с подобными материалами.

**МЕТОДИКА.** В качестве модели для исследования биосовместимости организма с инородными материалами использовалась популяция фагоцитирующих клеток крови доноров. После инкубирования при 37°C с 1% желатином в течение 45 мин, отбирали надосадочную жидкость, которую центрифугировали при 900 g в течение 12 мин, затем осадок дважды отмывали холодной средой 199 от желатина в том же режиме центрифугирования по 7 мин. После чего, клеточную взвесь в конечной концентрации  $2 \times 10^6$  по 15 мл разносили в чашки Петри, дно которых для исключения адгезии клеток было покрыто Parafilms (“Sigma”, США), затем в неё вносили исследуемые вещества в виде мелкодисперсного

порошка (300 мг) и инкубировали при 37°C в течение 15, 30, 45, 60 и 90 мин. После контакта с веществами взвесь фагоцитов разносили в микропланшеты по 100 мкл на лунку (в триплетах на каждый образец) и после инкубации при 37°C в течение 45 мин, надсадок удаляли, и клеточный монослой дважды отмывали от неадгезированных клеток тёплым раствором Хенкса без фенолового красного.

В качестве исследуемых агентов были взяты следующие вещества: 1 – керамика, 2 – титан, 3 – латекс, 4 – хирургическая сталь, 5 – медь. Контролем служили адгезированные к пластику клетки без добавления вышеуказанных веществ, после их инкубирования в течение тех же промежутков времени в чашке Петри с Parafilms.

Определение активности ферментов проводили в планшетах с монослоем клеток, предварительно фиксированным в парах формалина (15 мин).

Для определения активности АТРазы и 5'-нуклеотидазы к монослою клеток добавляли по 20 мкл субстрата для АТРазы (8 мг АТФ на 1 мл трис-НСl-буфера pH=7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 28,7 мг KCl, 52 мг MgCl<sub>2</sub> на 6 H<sub>2</sub>O) и 5'-нуклеотидазы (4 мг АМР на 1 мл такого же буфера, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl<sub>2</sub>). Образцы инкубировали при 37°C на 30 и 60 мин соответственно [8]. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1:1. Через 20 мин результаты учитывали спектрофотометрически при длине волны 620 нм.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) проводили по методу Лойда в собственной модификации [9]. К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл метилтиазолилтетразолий бромид (МТТ, "ICN", США) 2 мг/мл в 0,15 М фосфатном буфере pH=7,2 с 0,4% MnCl<sub>2</sub> и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl, в течение 20 мин. Оптическую плотность субстратов определяли спектрофотометрически при длине волны для лактатдегидрогеназы 492 нм и сукцинатдегидрогеназы 540 нм. В качестве контроля использовались образцы с раствором подкисленного изопропилового спирта без клеток.

Для определения активности миелопероксидазы к фиксированным клеткам вносили по 100 мкл ОФД (*o*-phenylenediamine, "ICN"), (4 мг/10 мл) в 0,05 М фосфатно-цитратном буфере (pH = 5,0) с добавлением 500 мкл 0,33% пероксида водорода. Монослой клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность субстратов определяли спектрофотометрически при длине волны 492 нм. В качестве контроля использовались образцы с раствором ОФД и 10% серной кислоты.

Для определения активности катионных белков (КБ) к фиксированному монослою клеток вносили 50 мкл раствора прочного зеленого (1 мг/мл, "Fast Green", "Serva", Германия) в метаноловом трис-буфере pH 8,0-8,2. После инкубирования при 37°C в течение 30 мин, несвязавшийся краситель дважды отмывали раствором Хенкса. Связанный с катионными белками клеток краситель растворяли добавлением диметилсульфоксида (50 мкл, ДМСО, "Serva"), предварительно разогретого в водяной бане до 80°C. Оптическую плотность полученных субстратов определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм, используя в качестве контроля образцы с ДМСО.

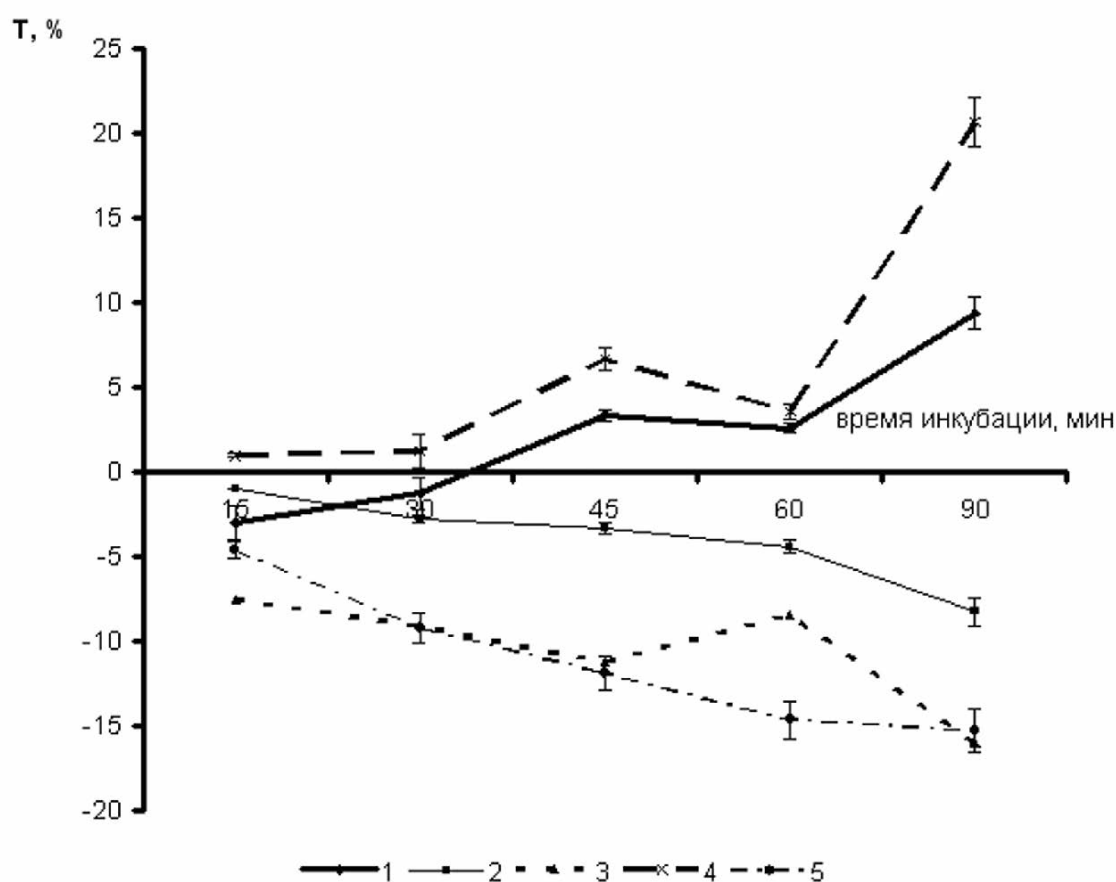
Результаты исследований представляли в виде индекса стимуляции фагоцитов – Т, который вычисляли по унифицированной формуле:

$$T = \frac{N_0 - N_k}{N_k} \cdot 100 ,$$

где N<sub>k</sub> – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата нестимулированных клеток; N<sub>0</sub> – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата стимулированных клеток.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При определении цитотоксического действия различных веществ на клетки используется метод, основанный на уменьшении внутриклеточного содержания метилтиазолилтетразолия бромид (МТТ). Преобразование МТТ в формазан происходит с помощью дегидрогеназ митохондрий, состояние которых отражает жизнеспособность клеток. В основном МТТ отражает активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ). СДГ принимает участие в реакциях дыхательной цепи митохондрий и цикле лимонной кислоты [10].

До 60 мин инкубации незначительное изменение активности СДГ было установлено нами в клетках, контактировавших с керамикой и титаном (рис. 1). Затем обнаруживалось в первом случае её повышение до  $9,4 \pm 0,78$ , а во втором – понижение до  $-8,2 \pm 0,65$ , что указывало на незначительное, по сравнению с другими инородными материалами, цитотоксическое воздействие керамики и титана на фагоциты. В то же время наибольшим цитотоксическим действием на клетки обладали латекс и медь.



**Рисунок 1.**

Активность сукцинатдегидрогеназы в фагоцитах, после их контакта с керамикой (1), титаном (2), латексом (3), хирургической сталью (4) и медью (5).  
Здесь и далее Т - индекс стимуляции клеток в %.

По основным биохимическим параметрам фагоциты не имеют принципиальных отличий от других клеток, однако характерной особенностью их метаболизма является способность к мгновенной активации под влиянием

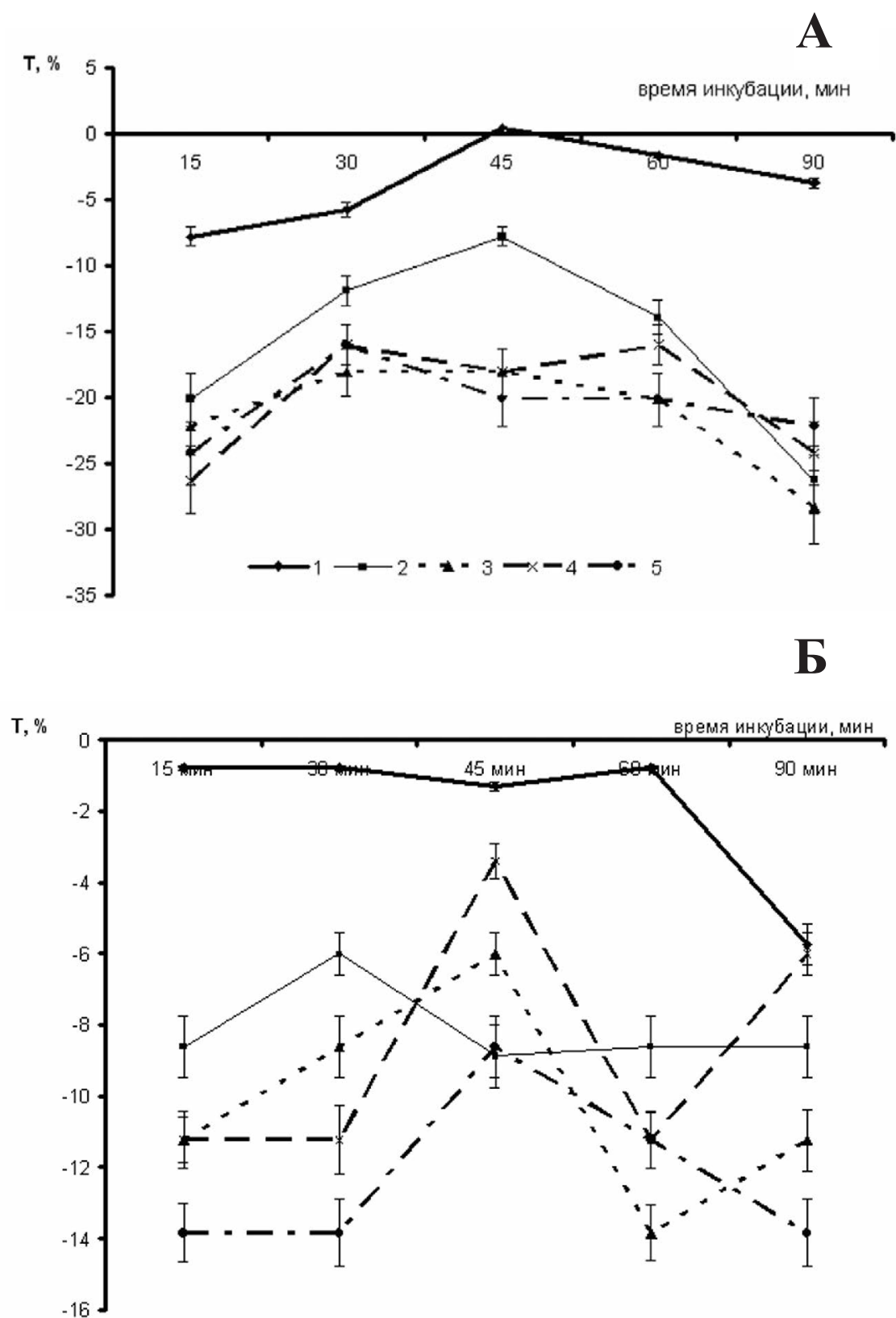
различных факторов экзогенного и эндогенного происхождения [11]. При этом преобразование этих клеток из нестимулированного состояния в стимулированное связано с пространственными изменениями их цитоплазматической мембраны, о чём свидетельствует изменение активности её эктоферментов 5'-нуклеотидазы и АТРаза. Связанный с внешней стороной плазматической мембраны гликозилфосфатидилинозитным остатком, фермент 5'-нуклеотидаза, или аденозин-5'-фосфатаза (эктоэнзим), используется как маркер комплекса ферментов, связанных с внешней поверхностью мембран клетки. 5'-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5.) катализирует гидролиз не только большинства нуклеозидфосфатов, но и многих дезоксирибонуклеозид – 5'-фосфатов. Аденозинтрифосфатаза (АТРаза, КФ 3.6.1.3.) клеточных мембран активируется ионами натрия и калия и относится к числу наиболее широко распространённых ферментных систем. Изменение его функциональной активности отражает процесс активации метаболизма клеток [12]. Таким образом, одним из характерных признаков активации фагоцитирующих клеток является наличие активности 5'-нуклеотидазы и АТРаза, о чём свидетельствует снижение их внутриклеточного содержания.

Активность эктоферментов плазматической мембраны фагоцитов после их контакта с исследуемыми веществами была различной. Нами определено незначительное изменение активности 5'-нуклеотидазы в фагоцитах, контактирующих с керамикой, которое достоверно не отличалось от показателей для интактных макрофагов на протяжении всего срока наблюдения (рис. 2А). Это связано со слабой реактивностью керамики на фагоциты. В то же время, при взаимодействии клеток с остальными используемыми нами инородными материалами активность фагоцитов находилась на высоком уровне. При этом показатели активности 5'-нуклеотидазы составили от  $-11,9 \pm 0,78\%$  после 30 мин контакта клеток с титаном до  $-28,3 \pm 1,06\%$  для фагоцитов, после воздействия на них латекса в течение 90 мин. Динамика изменения активности АТРаза в фагоцитах, после воздействия на них инородных материалов, совпадала с изменением активности 5'-нуклеотидазы, но на уровне меньших показателей (рис. 2Б). Высокая активность данного фермента в фагоцитах, контактировавших со всеми инородными материалами, за исключением керамики, варьировала от  $-6,0 \pm 0,48$  для фагоцитов, после их контакта с титаном, до  $-13,8 \pm 0,67$  для клеток, после воздействия на них меди в течение 90 мин.

Известно, что при различных патологических состояниях организма значительно увеличивается количество кислорода, потребляемого фагоцитирующими клетками. На первом этапе преобразования молекулы кислорода в супероксидный анион  $O_2^{\bullet-}$ , донором электронов является NADP-оксидазный комплекс. Второй этап – преобразование супероксидного аниона в следующий мощный окислительный компонент – пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) может происходить спонтанно или катализироваться супероксиддисмутазой. Миелопероксидаза, железосодержащий протеин, выступает в качестве катализатора следующего пути преобразования перекиси водорода в гидроксильный радикал ( $\bullet OH$ ) из гипохлорной кислоты ( $HOCl$ ) и супероксидного аниона. В настоящее время путь образования  $\bullet OH$  с этим ферментом носит название миелопероксидазно-пероксид водорода-хлоридная система [7]. В большей степени миелопероксидаза определяется в азурофильных гранулах нейтрофилов, в моноцитах определяется её небольшое количество.

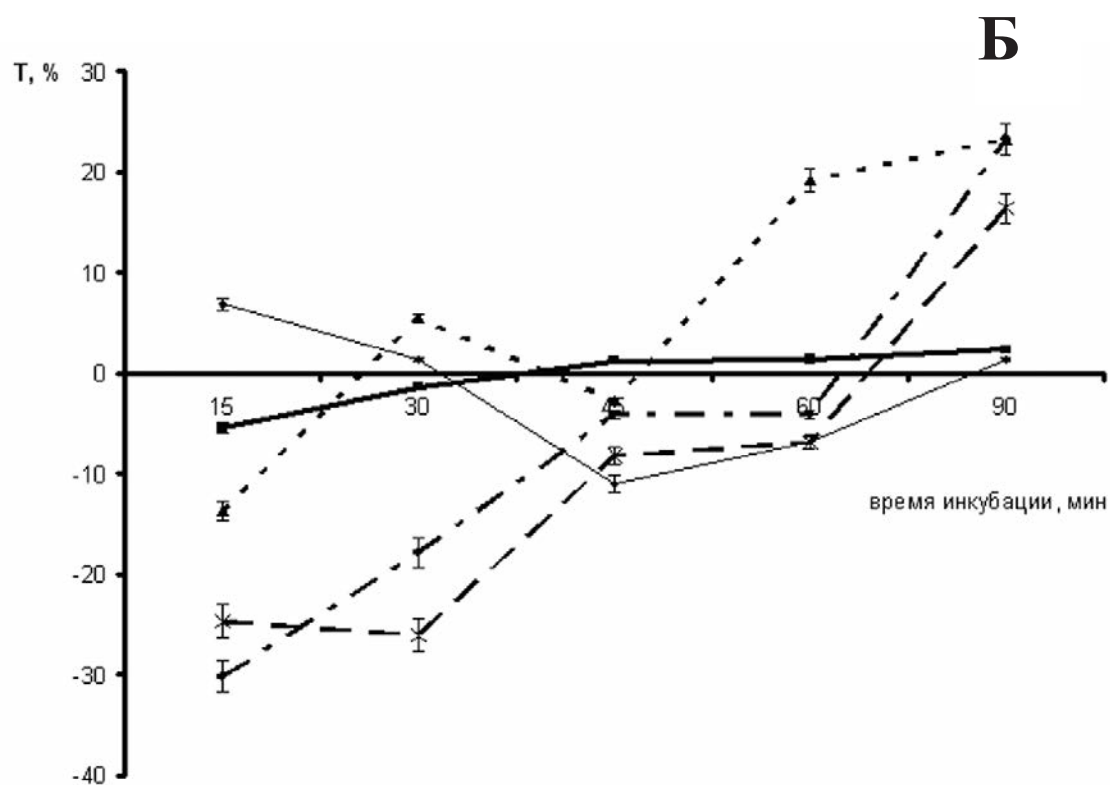
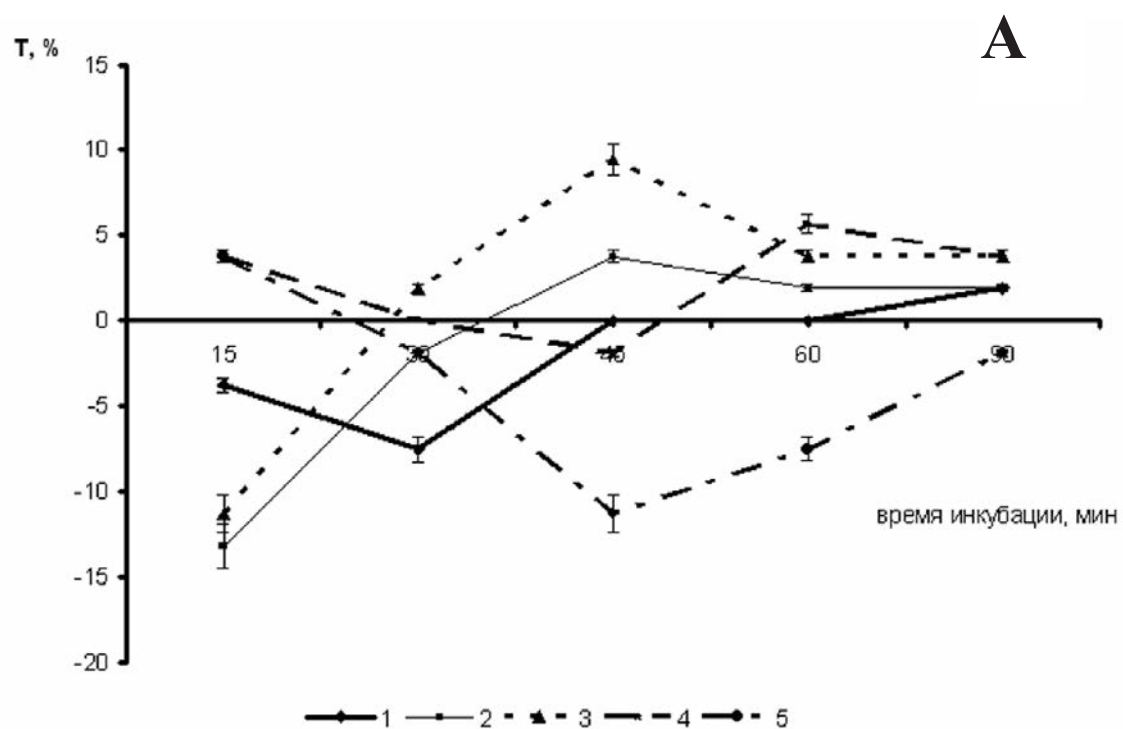
После инкубации фагоцитов с медью в течение 45 мин (рис. 3А) происходило снижение активности миелопероксидазы до  $-11,3 \pm 0,85\%$ . В последующие сроки активность этого фермента в клетках повышалась до уровня контроля. В фагоцитах, контактировавших с керамикой, активность миелопероксидазы находилась в пределах контроля, несколько понижаясь к 30 мин контакта. Эти данные указывали на минимальную стимуляцию фагоцитов в ответ на внесение керамики и титана, тогда как медь вызывала экскрецию миелопероксидазы клетками.





**Рисунок 2.**

Активность ферментов плазматической мембраны 5'-нуклеотидазы (А) и АТРаза (Б) фагоцитов, после их контакта с керамикой (1), титаном (2), латексом (3), хирургической сталью (4) и медью (5).



**Рисунок 3.**

Активность миелопероксидазы (А) и катионных белков (Б) в фагоцитах, после их контакта с керамикой (1), титаном (2), латексом (3), хирургической сталью (4) и медью (5).

В последние два десятилетия при исследовании нейтрофилов отмечается новая тенденция в идентификации широкого массива структурно и функционально разнообразных полипептидов, которые эти клетки способны выделять во внеклеточное пространство [13]. Особый интерес при исследовании белков цитоплазматических гранул нейтрофилов (а их более 40) вызывают катионные белки с низкой молекулярной массой, которые обладают суммарным положительным зарядом и бактерицидным действием. Эти протеины способны играть роль медиатора воспаления, фактора проницаемости, стимулятора метаболических процессов и служить источником неспецифических опсоинов при фагоцитозе, моделируя свертывание крови и стимулируя зависимый от комплемента лизис, адгезию и хемотаксис. Катионные белки по аминокислотному составу являются гистоноподобными белками и локализуются преимущественно в азурофильных гранулах зрелых нейтрофилов.

При изучении внутриклеточного содержания катионных белков было выявлено, что при контакте с исследуемыми веществами фагоциты выделяют эти биологически активные вещества во внеклеточное пространство (рис. 3Б). Наиболее наглядно данная активность клеток проявлялась после их контакта со сталью и медью. Так, снижение показателей отмечалось уже после 15 мин и они составили  $-24,6 \pm 1,06\%$  и  $-30,1 \pm 1,71\%$  соответственно. В клетках, после их контакта с керамикой и титаном отмечалось незначительное изменение внутриклеточного содержания катионных белков.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.** Несмотря на значительную гетерогенность и неоднородность клеток, в крови выделяются две субпопуляции класса фагоцитов близких по эффекторным функциям: нейтрофилы и моноциты. Свойства рецепторного аппарата и реакция этих клеток на различные патогены имеют схожие черты при некоторых различиях [14]. Тем не менее, учитывая значительное, по сравнению с моноцитами, содержание нейтрофилов в периферической крови и ферментативную специализацию этих клеток с их эффекторной активностью, можно считать, что основной клеткой, в начальные сроки реагирующей на любой патологический процесс, является нейтрофил. В норме большинство нейтрофилов и моноцитов крови находятся в состоянии покоя, а способность этих клеток к стимуляции тех или иных систем отражает их “готовность” к осуществлению главных функций, а именно к поглощению и перевариванию, которые, в дальнейшем обеспечивают антигенпредставляющие и иммунорегуляторные функции в защите организма при патологии [15]. Прицельное исследование как исходного состояния клеток крови (так называемое редок-состояние), так и отдельных его этапов в процессе стимуляции клеток, позволяет более точно охарактеризовать активность фагоцитарного звена иммунной системы [7]. Повсеместное распространение в организме, мобильность в передвижении и активное участие данных клеток в воспалительной реакции различной этиологии обеспечивает возможность судить о состоянии гомеостаза и его нарушениях, вызванных различными причинами, в том числе внедрением гетерогенных материалов. Таким образом, тестирование функций фагоцитирующих клеток, связанных с их реакционной активностью, имеет прогностическое значение для характеристики гомеостаза и контроля над развитием патологических процессов в ответ на внедрение инородных материалов.

В основу предлагаемой нами модели изучения биосовместимости организма с инородными материалами положено существенное изменение ферментативной активности фагоцитирующих клеток крови – нейтрофилов и моноцитов – в ответ на внесение стимулирующих агентов. Нами показана возможность комплексной оценки активации фагоцитов при их контакте с различными материалами и установлено, что наименее реактогенна в отношении фагоцитов керамика. Преимуществом этой модели является доступность предлагаемых методов определения показателей стимуляции нейтрофилов и моноцитов (эктоферменты плазматической мембраны 5'-нуклеотидаза и АТР-азы),



а также компонентов ферментных систем этих клеток (СДГ, миелопероксидазы и катионных белков). Возможность одновременного исследования в одном образце ряда параметров и объективность учёта результатов с помощью спектрофотометрии и унифицированного метода вычисления индекса стимуляции фагоцитов позволили дать комплексную оценку состояния клеток. На примере воздействия различных инородных материалов (керамика, титан, латекс, хирургическая сталь и медь) из которых могут быть изготовлены имплантанты и хирургические инструменты показано, что фагоциты после воздействия на них указанных материалов проявляют различную реакцию ферментных систем, степень выраженности которой можно выразить в виде цифровых данных. Причём, наиболее выраженными показателями является активность катионных белков и ферментов плазматических мембран этих клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Томолян А.А., Фрейдлин И.С.* (2001) Клетки иммунной системы. Наука, СПб.
2. *Labro M.-T.* (2000) Clin. Microbiol. Rev., **13**, 615-650.
3. *Yagil-Kelmer E., Kazmier P., Rahaman M.N., Bal B.S., Tessman R.K., Estes D.M.* (2004) J. Orthop. Res., **22**, 832-838.
4. *Bosetti M., Ottani V., Kozel D., Raspanti M., De Pasquale V., Ruggeri A., Cannas M.* (1999) Biomaterials., **20**, 363-370.
5. *Nocca G., De Sole P., Gambarini G., De Palma F., Parziale V., Giardina B., Lupi A.* (2006) Luminescence, **21**, 202-206.
6. *Liao S., Tamura K., Zhu Y., Wang W., Uo M., Akasaka T., Cui F., Watari F.* (2006) J. Biomed. Mater. Res., **76**, 820-825.
7. *Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* (1999) Успехи совр. биол., **119**, 462-475.
8. *Кирилlicheва Г.Б., Кирилличев А.А., Туманян М.А.* (1988) В кн. Иммуномодуляторы в инфекционной патологии, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва, с. 55-56.
9. *Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Крылова Н.В., Леонова Г.Н.* (2007) Биохимия, **72**, 236-246.
10. *Кольман Я., Рем К.-Г.* (2000) Наглядная биохимия, Мир, Москва.
11. *Воробьев А.И.* (2002) Руководство по гематологии, Т.1, Медицина, Москва.
12. *Зварич Е.И.* (1991) Биол. мембраны, **8**, 565-584.
13. *Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L.* (2000) Labor. Investig., **80**, 617-653.
14. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* (1989) Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Наука, Новосибирск.
15. *Levi O.* (2002) Expert. Opin. Investig. Drugs, **11**(2), 159-167.

Поступила: 02. 09. 2008.

**THE METABOLIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES AS THE MODEL  
FOR THE STUDY OF THE ORGANISM BIOCOMPATIBILITY  
WITH DIFFERENT MATERIALS**

*N.G. Plekhova, L.M. Somova, V.I. Puzdaev, E.I. Drobot*

Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS, 690087, Selskaya, 1, Vladivostok,  
Russia; tel.: +7 (4232) 442-434; fax: (4232) 441-147; e-mail: pl\_nat@hotmail.com

In stimulated status neutrophils and monocytes in the foci of introduction the different materials are capable to excrete of biologically active substances by means of which if influence on processes of reparation. The express changes of blood leukocytes activity in response on the introduction of stimulated agents are assume as a basis of the proposed model of the organism biocompatibility with different materials. On example of the influence of different materials (ceramics, titanium, latex, surgical steel and copper), from which can be made implant and surgical instruments it was showed that the leukocytes were showed the different reaction of enzyme systems. This model allows the completely and objectively to study the influence of different materials on the neutrophyls and monocytes – the effected cells of the inflammatory process. Moreover, the activity of cation proteins and plasma membrane enzymes of leukocytes is the most expressed factor.

**Key words:** neutrophils, monocytes, enzymes, biocompatibility, different materials.