

УДК: 616.155.3-008.13

© Коллектив авторов

## ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МОНОЦИТ–ПРОИЗВОДНЫМИ МАКРОФАГАМИ ИЗ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

*М.В. Биленко<sup>1\*</sup>, Ю.А. Владимиров<sup>2</sup>, С.А. Павлова<sup>1</sup>,  
Туй Нгуен Тхи Тху<sup>1</sup>, Йен Чан Тхи Хай<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ГУ НИИ Биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва,  
ул. Погодинская, д.10; тел.: 8 (495) 246-50-72; факс: 8 (495) 248-08-57;  
эл. почта: Marianna.Bilenko@mail.ru

<sup>2</sup>Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Продукция активных форм кислорода (АФК) макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров (МФ<sub>Н</sub>) и больных ИБС (МФ<sub>ИБС</sub>) до, во время и после их совместной инкубации с ЛПНП, полученными из плазмы крови здоровых доноров (ЛПНП<sub>Н</sub>) и людей с гиперхолестеринемией (ЛПНП<sub>Г</sub>) была исследована методом люминол-зависимой и стимулированной хемилюминесценции (ХЛ). В качестве стимуляторов ХЛ были использованы опсонизированный зимозан (ОЗ) и форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА). Показано, что собственная, люминол-зависимая и стимулированная ОЗ или ФМА ХЛ МФ<sub>ИБС</sub> превышали те же виды ХЛ МФ<sub>Н</sub> в 1,4, 1,8, 2,7 и 1,6 раза, соответственно ( $p < 0,05 - 0,01$ ). Стимулирующий эффект ОЗ был сильнее эффекта ФМА в 4,3 раза (МФ<sub>Н</sub>) и в 3,2 раза (МФ<sub>ИБС</sub>), но проявлялся в 2,5 – 3,0 раза медленнее. ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>, инкубированные с МФ<sub>Н</sub>, в первые 15 и 60 минут повышали люминол-зависимую ХЛ МФ<sub>Н</sub> в 1,4 и 2,5 раза, соответственно, но не влияли на продукцию АФК в МФ<sub>ИБС</sub>. После 15-180 минут преинкубации МФ<sub>Н</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>, удаления ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>, отмывки МФ и добавления среды Хенкса и ОЗ повторный рост ОЗ-активированной ХЛ МФ<sub>Н</sub> был выражен сильнее при инкубации с ЛПНП<sub>Г</sub>, чем с ЛПНП<sub>Н</sub>, но отсутствовал в опытах с МФ<sub>ИБС</sub>. Таким образом, выявлена более высокая интенсивность ХЛ макрофагов, полученных из крови больных ИБС, свидетельствующая об их стимуляции *in vivo*; доказана способность ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> первично и повторно (после преинкубации) усиливать ХЛ в МФ<sub>Н</sub>, но не в МФ<sub>ИБС</sub>. Сделан вывод о том, что ХЛ является чувствительным тестом на степень стимуляции макрофагов и может служить контролем за эффектом применяемой больной терапией.

**Ключевые слова:** моноцит-производные макрофаги крови человека, АФК, ЛПНП, хемилюминесценция, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Макрофаги являются основной причиной окислительной модификации ЛПНП и ответственны за их потребление и метаболизм, что ведет к ранним атеросклеротическим изменениям в стенке сосудов [1, 2]. В то же время известно, что как окисление, так и потребление макрофагами ЛПНП возможно лишь после стимуляции макрофагов, обусловленной воздействием на них гуморальных и физических факторов (ФНО- $\alpha$ , IL 1-6, окЛПНП, АФК, ишемия и др.),

**Список сокращений:** АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПНП<sub>Н</sub> – липопротеины низкой плотности, полученные из плазмы крови здоровых доноров; ЛПНП<sub>Г</sub> – липопротеины низкой плотности, полученные из плазмы крови людей с гиперхолестеринемией; МФ – макрофаги, полученные из крови человека; МФ<sub>Н</sub> – макрофаги, полученные из моноцитов крови здоровых доноров; МФ<sub>ИБС</sub> – макрофаги, полученные из моноцитов крови больных ИБС; ОЗ – опсонизированный зимозан; ТБК-РП – ТБК-реактивные продукты; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; ХЛ – хемилюминесценция.

\* – адресат для переписки

и происходит как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [3-5]. Ранее нами было показано, что макрофаги, полученные из моноцитов крови больных ИБС (МФ<sub>ИБС</sub>), более активно окисляют и потребляют ЛПНП по сравнению с макрофагами из моноцитов крови здоровых доноров (МФ<sub>Н</sub>), то есть прямыми методами была доказана способность моноцит-производных макрофагов подвергаться стимуляции в организме больных ИБС *in vivo* [6, 7]. Стимуляция была обнаружена и в полиморфно-ядерных лейкоцитах, полученных от людей и экспериментальных животных с воспалительными и ишемическими заболеваниями [8, 9], используя хемилюминесцентный (ХЛ) метод, позволяющий оценить начальный этап и динамику продукции клетками АФК. Однако, начальные сроки и способность к усилению продукции АФК макрофагами, полученными из моноцитов крови больных ИБС с использованием ХЛ метода, практически не изучены.

Задачей настоящего исследования явилось сравнение динамики продукции АФК макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров и больных ИБС (МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub>) с помощью ХЛ метода, использованного до, во время и после инкубации макрофагов с ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>, а также сопоставление динамики продукции макрофагами АФК с ранее изученной степенью окисления ЛПНП и жизнеспособностью макрофагов.

**МЕТОДИКА.** Кровь получали из локтевой вены 19 здоровых доноров и 15 больных ИБС, натошак, в пластиковую пробирку с гепарином (50 ед. гепарина на 10 мл крови) в отделении переливания крови Всероссийского научного центра хирургии РАМН (ВНЦХ). Средний возраст здоровых доноров составлял 44 года (от 21 до 59), пациентов с ИБС - 57 лет (от 36 до 74). 93% пациентов с ИБС были мужчины. Стенокардия была выявлена у 12 пациентов, из них стенокардия напряжения - у 7 пациентов. Тяжесть стенокардии определяли по Канадской классификации. Сопутствующая артериальная гипертензия была выявлена у 7 пациентов, предшествовавший инфаркт миокарда - у 9 пациентов. У 1 пациента была выявлена аневризма левого желудочка. Диагноз устанавливали врачи кардиологического отделения ВНЦХ.

Моноциты выделяли при 400 g (центрифуга Janetzki K23) путём наслаивания крови на Ficoll-Paque в соотношении 3:5 и центрифугирования в течение 20 мин. Интерфазу отсасывали и центрифугировали 15 мин в тех же условиях. Полученные клетки, главным образом моноциты, отмывали раствором PBS и разводили средой "роста" (RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, 300 ед/мл гентамицина, 2 mM L-глутамина, 1mM Na-пирувата, pH 7,4) и разливали в пробирки (d = 10 мм, h = 54 мм) по 500 мкл. Пробирки с клетками инкубировали 20 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ("Assab", Швеция) при 37°C в присутствии 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub> в условиях высокой влажности. ЛПНП (d = 1,019–1,065 г/мл) изолировали из плазмы крови 12 здоровых доноров (ЛПНП<sub>Н</sub>, общий холестерин плазмы составлял 2,6–4,4 mM) и из плазмы крови 12 гиперхолестеринемичных пациентов (ЛПНП<sub>Г</sub>, общий холестерин плазмы, составлял 6,2–8,54 mM) путем ультрацентрифугирования в градиентах NaBr + ЭДТА (первый градиент - d = 1,019, n<sub>D</sub><sup>26</sup> = 1,3363; второй градиент - d = 1,065, n<sub>D</sub><sup>26</sup> = 1,3445) два раза по 2 часа, при 111000 g в ультрацентрифуге L8-80 ("Beckman", США), снабженной Ti-90 ротором. ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>, содержащие NaBr и ЭДТА, накануне применения диализовали в мешочках ("Serva", США) в течение 18 ч при +4°C против 6000 объемов 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4) без добавления ЭДТА и антиоксидантов. Для стерилизации использовали микрофильтры (0,45 мкм, "Serva"). Белок определяли по методу Лоури.

В 20-часовых культурах МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> перед добавлением ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> (200 мкг на 500 мкл среды) среду "роста" меняли на среду "инкубации" (RPMI 1640 с добавлением только гентамицина 300 ед/мл, pH 7,4) и совместно инкубировали в течение 15, 60, 180 и 360 минут. Для измерения ХЛ в свежеприготовленных культурах МФ среду "инкубации" меняли на раствор Хенкса, для измерения ХЛ в процессе совместной инкубации макрофагов с

ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> среду “инкубации” не меняли. Для измерения ХЛ макрофагов после заданных сроков преинкубации МФ с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, “инкубации”, среду, содержащую ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, отсасывали, макрофаги отмывали PBS и в пробирки добавляли среду Хенкса.

Оценку ХЛ проводили на хемилюминиметре Lum-5773 (“IntrOptica”, Россия); сбор и расчет данных осуществляли с помощью программы PowerGraph. В каждой пробе измеряли собственную ХЛ (без добавок), люминол-зависимую ХЛ (с добавлением 20 мкМ люминола в среду инкубации) и стимулированную ХЛ (после добавления в раствор стимуляторов: опсонизированного зимозана - (ОЗ, 0,1 мг/мл), или форбол-12-миристан-13-ацетата – (ФМА, 1 нг/мл). ХЛ оценивали по максимальному подъему амплитуды (V) и коэффициентам: люминол-зависимому (отношение люминол-зависимой ХЛ к собственной), коэффициенту стимуляции (отношение ОЗ стимулированной ХЛ или ФМА стимулированной ХЛ к люминол-зависимой ХЛ), а также ЛПНП-зависимому (отношение ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> стимулированной ХЛ к люминол-зависимой).

Измерение ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП) проводили на спектрофотометре Beckman DU-7, оптическую плотность рассчитывали в максимуме поглощения (532 нм). Количество ТБК-РП выражали через эквивалентное количество малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент молярной абсорбции, равный 156000 М<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> [10].

Число жизнеспособных макрофагов оценивали по числу клеток, оставшихся прикрепленными к стенкам пробирки после заданного срока инкубации [11]. Макрофаги снимали со стенок пробирки и подсчитывали в камере Горяева.

Статистическую обработку проводили вычислением средней арифметической (X), среднего квадратичного отклонения ( $\pm$  SEM) и критерия Стьюдента (t) для малых связанных выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

### 1. Сравнительная оценка различных видов ХЛ в свежеприготовленных культурах МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> до их инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub>.

Активность ХЛ МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub>, в зависимости от источника получения (вида) и количества клеток приведена в таблице. Из таблицы видно, что при количестве клеток, равном 200×10<sup>3</sup>, 400×10<sup>3</sup> и 1000×10<sup>3</sup>, стимулированная ОЗ ХЛ МФ<sub>ИБС</sub> превышала ХЛ того же количества МФ<sub>Н</sub> в 4,3, 2,5 и 3,5 раза, соответственно (во всех случаях <sup>##</sup>p<0,01). Количество клеток, равное 400×10<sup>3</sup>, являлось величиной достаточно чувствительной и в то же время достоверно отличающейся от предыдущего и последующего количества клеток. Вследствие этого количество МФ, равное 400×10<sup>3</sup>, было использовано в последующих опытах.

Таблица. Зависимость ХЛ от вида и количества макрофагов.

Вид МФ	Количество МФ и активность ХЛ (V)			
	100×10 <sup>3</sup>	200×10 <sup>3</sup>	400×10 <sup>3</sup>	1000×10 <sup>3</sup>
МФ <sub>Н</sub>	0,9 ± 0,29	3,4 ± 0,85	9,7 ± 1,91 <sup>*</sup>	19,9 ± 8,26 <sup>*</sup>
МФ <sub>ИБС</sub>	5,1 ± 1,27	14,5 ± 3,43 <sup>###</sup>	23,83 ± 2,65 <sup>***##</sup>	69,7 ± 0,327 <sup>***##</sup>

Примечание: Значимость различий между активностью ХЛ данного количества макрофагов по сравнению с предыдущим количеством клеток, \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; Значимость различий между активностью ХЛ в МФ<sub>ИБС</sub> и МФ<sub>Н</sub> при использовании одинакового количества клеток, ## - p<0,01; <sup>†</sup> - активацию МФ проводили ОЗ. Число независимых опытов (n) равно 3.

В первой части исследования (рис. 1) были сопоставлены величины собственной (1) люминол-зависимой (2), стимулированной ФМА (3) и стимулированной ОЗ (4) ХЛ в МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub>, взятых в количестве 400×10<sup>3</sup>, без их инкубации с ЛПНП. Величины ХЛ составляли: 0,09±0,003; 0,53±0,06; 5,58±1,47; 23,72±2,25 (V) в МФ<sub>Н</sub> соответственно, и 0,13±0,01; 0,96±0,18; 11,61±1,79;

## ПРОДУКЦИЯ АФК МАКРОФАГАМИ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

36,87±4,89 (V) в МФ<sub>ИБС</sub> соответственно, превышая ХЛ в МФ<sub>Н</sub> в 1,4, 1,8, 2,7 и 1,6 раза (<sup>###</sup>p<0,05, p<0,01). Коэффициенты люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> составляли 5,9 и 7,4 (<sup>oo</sup>p<0,01), коэффициенты ФМА стимулированной ХЛ составляли 10,5 и 12,1 (<sup>oo</sup>p<0,01), коэффициенты зимозан активированной ХЛ - 44,8 и 38,4 (<sup>oo</sup>p<0,01) для МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> соответственно.

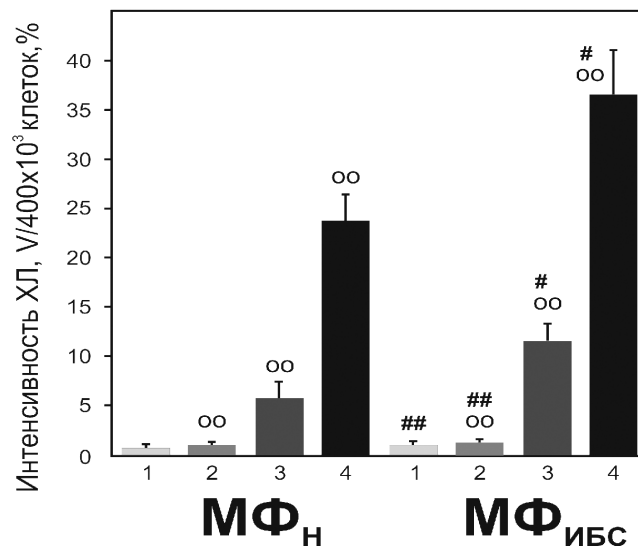


Рисунок 1.

Сравнение интенсивности собственной (1), люминол-зависимой (2), стимулированной ФМА (3) или зимозаном (4) хемилюминесценции макрофагов от здоровых доноров (МФ<sub>Н</sub>) и больных ИБС (МФ<sub>ИБС</sub>) до их инкубации с ЛПНП (V).

Примечание: Значимость различий между одинаковыми видами хемилюминесценции макрофагов доноров и больных: # - p<0,05; ###-p<0,01. Значимость различий между люминол-зависимой ХЛ и собственной ХЛ, активированными видами ХЛ и люминол-зависимой ХЛ в МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub>: o - p <0,05; oo - p<0,01. Число независимых опытов (n) равно 6.

ОЗ в использованной концентрации (0,1 мкг/мл) являлся более сильным стимулятором как МФ<sub>Н</sub>, так и МФ<sub>ИБС</sub>, по сравнению с ФМА (1 нг/мл). В то же время ФМА даже в меньшей дозе вызывал более быстрый максимальный подъем кривой ХЛ (в течение 10-12 минут), по сравнению с ОЗ (в течение 30-40 минут).

Более сильное по интенсивности и более медленное по длительности стимулирующее действие зимозана, по сравнению с ФМА, по-видимому, связано с разными механизмами их действия на макрофаг. Известно, что ФМА легко диффундирует через клеточную мембрану и необратимо активирует цитозольную протеинкиназу С, а через нее - NADPH-оксидазу, при этом активация макрофагов может происходить независимо от внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> [4, 12]. В отличие от ФМА, зимозан лишь постепенно поглощается рецепторами комплемента С3 наружной мембраны клетки и стимуляция макрофагов происходит по полному циклу, включающему изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup>, активацию протеинкиназы С, тирозинкиназы и, наконец, активацию NADPH-оксидазы [13]. В последующих опытах нами для стимуляции ХЛ был использован в основном зимозан.

**2. Сравнительная оценка интенсивности люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> в процессе 15–360 минут их совместной инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> (1) и ЛПНП<sub>Г</sub> (2); сопоставление ХЛ со степенью окислительной модификации ЛПНП и жизнеспособностью макрофагов.**

Данные второй части исследования представлены на рисунке 2. Видно, что ЛПНП<sub>Н</sub> (I, 3) и ЛПНП<sub>Г</sub> (I, 4) в среде “инкубации” без МФ (контроль) вызывали слабую люминол-зависимую ХЛ, которая в течение 15-360 мин инкубации практически не менялась или снижалась. МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> до добавления ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> вызывали более выраженную люминол-зависимую ХЛ, равную

$0,25 \pm 0,04$  и  $1,08 \pm 0,23$  V, соответственно, эти величины были приняты за контроль (100%). При добавлении ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> к среде, содержащей МФ<sub>Н</sub>, уже через 15 мин наблюдалось умеренное, а через 60 минут – достоверное повышение люминол-зависимой ХЛ (в 1,4 и 2,5 раза по сравнению с контролем,  $*p < 0,05$ ). Таким образом, для МФ<sub>Н</sub> коэффициенты ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> стимулированной ХЛ составляли 1,4 и 2,5 соответственно. Совместная инкубация ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> с МФ<sub>ИБС</sub> в течение 15–60 минут люминол-зависимой ХЛ достоверно не меняла, то есть в отличие от МФ<sub>Н</sub> для МФ<sub>ИБС</sub> коэффициенты ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> стимулированной ХЛ были равны нулю.

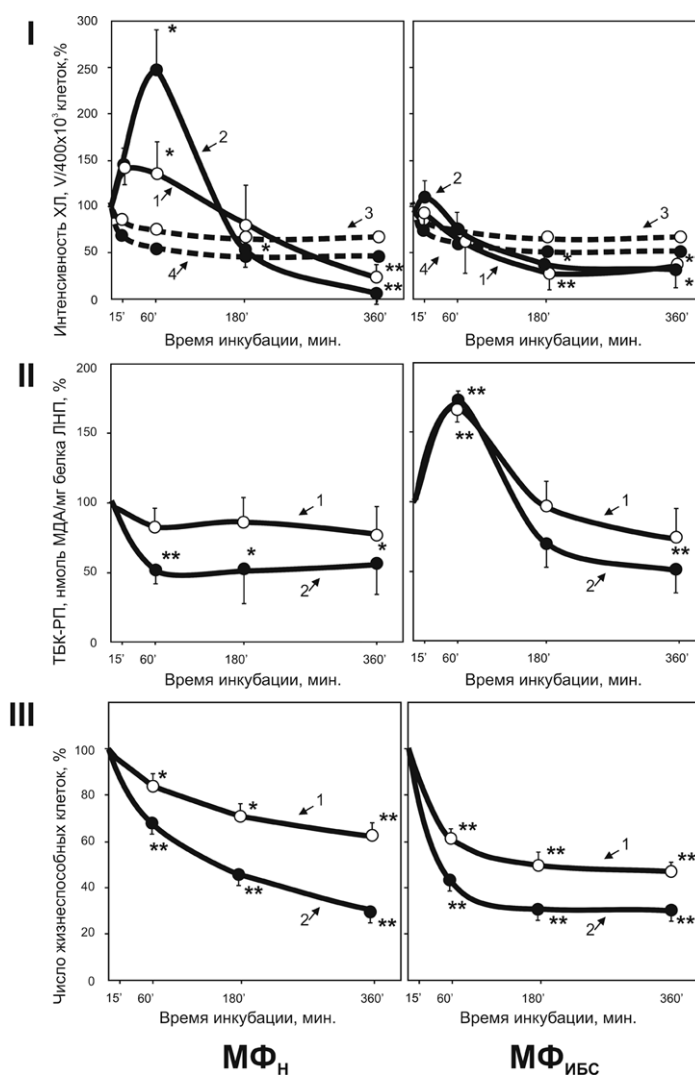


Рисунок 2.

Инкубация МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> (1) или ЛПНП<sub>Г</sub> (2) в течение 15 – 360 минут: оценка интенсивности люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> (I, V/400x10<sup>3</sup> клеток, %); степень окисления ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> во время инкубации с МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> (II, нмоль МДА/мг белка ЛПНП, %); динамика жизнеспособности макрофагов (III, %).

Примечание: I - В опытах с люминол-зависимой ХЛ макрофагов исходом служила интенсивность люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>Н</sub> или МФ<sub>ИБС</sub> до добавления к ним ЛПНП<sub>Н</sub> (1) или ЛПНП<sub>Г</sub> (2) (взятая для каждого МФ за 100%); в контролях на ЛПНП<sub>Н</sub> (3) или ЛПНП<sub>Г</sub> (4) исходом служила начальная люминол-зависимая ХЛ самих ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> (принятое за 100%); II – В опытах с оценкой ТБК-РП исходом служило среднее суммарное содержание ТБК-РП в ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> до инкубации с макрофагами (принятое за 100%); III – В опытах с оценкой количества жизнеспособных макрофагов исходом служило количество жизнеспособных МФ<sub>Н</sub> или МФ<sub>ИБС</sub> до инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> (равное  $400 \times 10^3$  клеток, принятое за 100%); Значимость различий с контролем: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ .

Число независимых опытов (n) равно 6.



Начиная со 180 минут инкубации ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> с МФ<sub>Н</sub>, и начиная с 60 минут их инкубации с МФ<sub>ИБС</sub>, наблюдалось снижение ХЛ, которая через 360 минут была достоверно ниже контроля в опытах с МФ<sub>Н</sub> (в 2,2–2,6 раза,  $^{**}p<0,01$ ), в опытах с МФ<sub>ИБС</sub> (в 4–7 раза,  $^{**}p<0,01$ ). Оценку АФК продуцирующей функции макрофагов ХЛ методом при их совместной инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> затрудняло возможное взаимодействие АФК как с ЛПНП, так и с люминолом [14].

Таким образом, совместная инкубация МФ<sub>Н</sub> или МФ<sub>ИБС</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> выявила раннюю, но кратковременную активацию АФК-продуцирующей функции лишь МФ<sub>Н</sub>. При этом ЛПНП<sub>Г</sub> вызывали более выраженное усиление ХЛ макрофагов, чем ЛПНП<sub>Н</sub>, что, видимо, связано с изначально более высокой окисленностью ЛПНП<sub>Г</sub> [15], и вследствие этого, их более сильным активирующим действием на макрофаги [16, 17].

Отсутствие роста люминол-зависимой ХЛ у МФ<sub>ИБС</sub> под влиянием как ЛПНП<sub>Н</sub>, так и ЛПНП<sub>Г</sub>, сочеталось с ранее выявленным [7] увеличением количества ТБК-РП в ЛПНП, которое в течение первых 60 минут совместной инкубации МФ<sub>ИБС</sub> и с ЛПНП<sub>Н</sub>, и, особенно, с ЛПНП<sub>Г</sub> было выше исходного в 1,6 и 1,7 раза (рис. 2, II,  $^{**}p<0,01$ ). Таким образом, результаты люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>ИБС</sub> и продукции ТБК-РП в ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> имели обратную направленность, что может быть обусловлено быстрым присоединением АФК к ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, а также меньшей устойчивостью ЛПНП<sub>Г</sub> к окислению, в связи со сниженным в них содержанием витаминов А и Е [18]. С другой стороны, не исключено, что отсутствие стимулирующего действия ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> на люминол-зависимую ХЛ МФ<sub>ИБС</sub> может быть опосредовано наличием на поверхности уже активированных *in vivo* макрофагов сквенджер рецепторов, приводящих к захвату как ЛПНП<sub>Г</sub>, так и ЛПНП<sub>Н</sub> [19]. Неограниченное потребление с помощью сквенджер рецепторов ЛПНП<sub>Г</sub> макрофагами, полученными от больных ИБС, а также способность этих рецепторов к частичному потреблению и ЛПНП<sub>Н</sub> [2] не только снижает ХЛ, но и, вследствие усиленного фагоцитоза, ведет к образованию пенистых клеток с последующей гибелью макрофагов. Действительно, количество жизнеспособных макрофагов после 1 часа их совместной инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, согласно нашим данным, приведенным в работе [7] снижалось в опытах с МФ<sub>Н</sub> - в 1,2 и 1,5 раза ( $^{***}p<0,05-0,01$ ), а в опытах с МФ<sub>ИБС</sub> - в 1,6 и 2,4 раза ( $^{**}p<0,01$ ) соответственно (рис. 2, III). Отсюда очевидно, что снижение интенсивности люминол-зависимой ХЛ как в МФ<sub>Н</sub>, так и в МФ<sub>ИБС</sub> на поздних (через 360 минут) сроках их инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> и с ЛПНП<sub>Г</sub>, может зависеть и от резкого снижения количества жизнеспособных макрофагов.

Причины снижения ТБК-РП в среде “инкубации” после 30 мин (опыты с МФ<sub>Н</sub>) или после 60 мин (опыты с МФ<sub>ИБС</sub>, особенно с ЛПНП<sub>Г</sub>) могут быть обусловлены поглощением макрофагами ЛПНП<sub>Г</sub>, а отсутствие роста или снижение ТБК-РП при инкубации ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> с МФ<sub>Н</sub> может быть объяснено двойной ролью МФ<sub>Н</sub> в процессе взаимодействия с ЛПНП, а именно способностью МФ<sub>Н</sub> как окислять, так и снижать окисленность ЛПНП за счет антиоксидантных систем макрофага [20].

### **3. Сравнительная оценка интенсивности стимулированной зимозаном ХЛ МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> после 15–360 минут их преинкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>.**

Данные третьей части исследования представлены на рисунке 3. Величина ОЗ-стимулированной ХЛ контрольных МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> составляла  $24,4 \pm 3,77$  и  $40,4 \pm 9,84$  (V) соответственно. Она была принята за 100% для каждого вида макрофага.

Интенсивность ОЗ стимулированной ХЛ контрольных МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> в процессе 15–360 минут инкубации (рис. 3, линия 3) умеренно, но недостоверно снижалась.

Преинкубацию МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> проводили в течение 15, 60, 180 или 360 мин, затем ЛПНП удаляли, макрофаги отмывали, в пробирки заливали среду Хенкса, в которую добавляли ОЗ (0,1 мкг/мл).

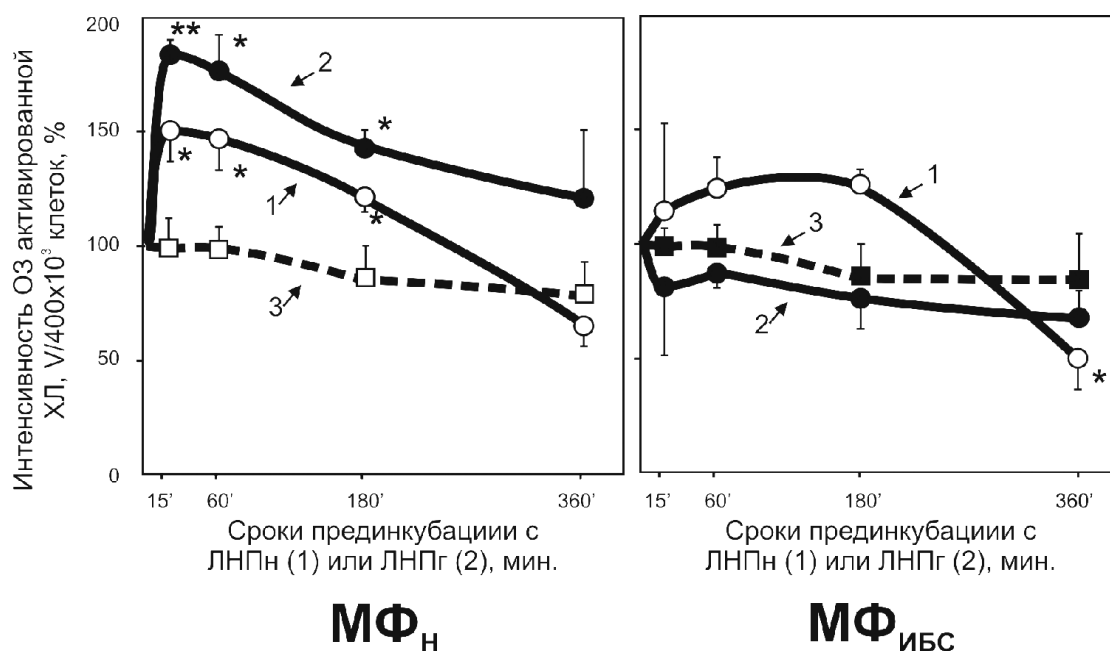


Рисунок 3.

Оценка интенсивности стимулированной зимозаном ХЛ макрофагов от здоровых доноров (МФ<sub>Н</sub>) и больных ИБС (МФ<sub>ИБС</sub>) после преинкубации клеток в течение 15 – 360 минут с ЛПНП<sub>Н</sub> (1) или ЛПНП<sub>Г</sub> (2) ( $V/400 \times 10^3$  клеток, %).

Примечание: После преинкубации макрофагов ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> удаляли из среды путем центрифугирования, макрофаги отмывали, среду инкубации заменяли на среду Хенкса.

Значимость различий с контролем: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ;

Число независимых опытов (n) равно 6.

В опытах с МФ<sub>Н</sub> после 15, 60 и 180 мин их преинкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> ОЗ-стимулированная повторная ХЛ возрастала в 1,5, 1,5 и 1,2 раза; после преинкубации с ЛПНП<sub>Г</sub> - в 1,8, 1,76 и 1,5 раза (рис. 3, кривые 1 и 2, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). В опытах с МФ<sub>ИБС</sub> достоверного изменения повторной, ОЗ-стимулированной ХЛ, в пробах, сначала подвергнутых преинкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, выявлено не было. К 360 минутам в пробах с ЛПНП<sub>Н</sub> наблюдалось умеренное, а в пробах с ЛПНП<sub>Г</sub> - выраженное снижение ОЗ-стимулированной ХЛ в обоих видах макрофагов.

Таким образом, оценка интенсивности ОЗ-стимулированной ХЛ после преинкубации макрофагов с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> в течение 15, 60, 180 и 360 мин, их последующей отмывки от ЛПНП, смены среды и добавления зимозана выявила умеренную вторичную активацию лишь МФ<sub>Н</sub>. По-видимому, функциональные возможности МФ<sub>ИБС</sub> были исчерпаны в процессе их преинкубации с ЛПНП, что привело к отсутствию, в отличие от МФ<sub>Н</sub>, их вторичной стимуляции зимозаном.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проведена сравнительная оценка способности свежеполученной культуры МФ<sub>Н</sub> и МФ<sub>ИБС</sub> продуцировать АФК спонтанно, а также под влиянием люминола, опсонизированного зимозана, форбол-13-мириостат-12-ацетата и липопротеинов низкой плотности, полученных из крови здоровых доноров (ЛПНП<sub>Н</sub>) и людей с гиперхолестеринемией (ЛПНП<sub>Г</sub>).

Показано, что стимулированная ХЛ зависит от числа исследуемых макрофагов и может характеризовать количество жизнеспособных клеток в пробе; все виды ХЛ в МФ<sub>ИБС</sub> при одинаковом числе клеток ( $400 \times 10^3$ ) были достоверно выше ( $p < 0,05-0,01$ ), чем те же виды ХЛ в МФ<sub>Н</sub>: собственная и люминол-зависимая ХЛ в МФ<sub>ИБС</sub> выше в 1,4 и 1,8 раза, активированная ОЗ и ФМА ХЛ выше в 1,6 и в 2,7 раза.

## ПРОДУКЦИЯ АФК МАКРОФАГАМИ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

Стимулятор ХЛ - опсонизированный зимозан в использованных дозах обладал более сильным, по сравнению с ФМА, действием, но его эффект проявлялся в 2-3 раза медленнее. Совместная инкубация ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> с МФ<sub>Н</sub> вызывала кратковременный (15–60 минут) рост люминол-зависимой ХЛ (в 1,4 и 2,5 раза выше), по сравнению с контролем, который затем сменялся ее достоверным падением, в то время как инкубация ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> с МФ<sub>ИБС</sub> роста ХЛ не вызывала, а вела к ее постепенному снижению.

Преинкубация МФ<sub>Н</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> в течение 15, 60 и 180 мин с последующим удалением ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> и отмыванием от них МФ<sub>Н</sub> сопровождалась вторичной ОЗ-активированной ХЛ, причем реакция на ЛПНП<sub>Г</sub> была выражена резче, чем на ЛПНП<sub>Н</sub>. МФ<sub>ИБС</sub> после 15, 60 и 180 минут инкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> на повторную стимуляцию опсонизированным зимозаном не реагировали, что, по-видимому, обусловлено более активным окислением и потреблением ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> макрофагами в процессе преинкубации с ними, приводящими к истощению резервных возможностей клеток и (или) существенному уменьшению числа жизнеспособных МФ<sub>ИБС</sub>.

### ВЫВОДЫ:

1) Собственная, люминол-зависимая и стимулированная (ОЗ или ФМА) ХЛ 20-ти часовой культуры макрофагов, полученных из моноцитов крови больных ИБС (МФ<sub>ИБС</sub>) *in vitro* достоверно выше, чем те же виды ХЛ культуры макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров (МФ<sub>Н</sub>).

2) Совместная инкубация 20-ти часовой культуры МФ<sub>Н</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> в течение 15 и 60 минут сопровождается усилением люминол-зависимой ХЛ МФ<sub>Н</sub>, при этом ЛПНП<sub>Г</sub> обладают более выраженным стимулирующим эффектом, чем ЛПНП<sub>Н</sub>. Совместная инкубация МФ<sub>ИБС</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub> усиления люминол-зависимой ХЛ не вызывает, но, в отличие от МФ<sub>Н</sub>, сопровождается ростом ТБК-РП в ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> и более выраженным снижением количества жизнеспособных МФ<sub>ИБС</sub>.

3) Преинкубация МФ<sub>Н</sub> с ЛПНП<sub>Н</sub> и, особенно, с ЛПНП<sub>Г</sub> в течение 15, 60 и 180 минут с последующим удалением ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, отмыванием макрофагов и добавлением ОЗ способна в 1,5 (ЛПНП<sub>Н</sub>) и в 1,8 (ЛПНП<sub>Г</sub>) раз усилить вторичную активированную зимозаном ХЛ ( $p < 0,05-0,01$ ). МФ<sub>ИБС</sub> после преинкубации с ЛПНП<sub>Н</sub> или ЛПНП<sub>Г</sub>, удаления ЛПНП<sub>Н</sub> и ЛПНП<sub>Г</sub> и отмывания макрофагов на вторичную стимуляцию не реагируют.

4) Метод люминол-зависимой ХЛ в настоящее время нами используется в качестве экспресс-модели для оценки исходной степени стимуляции макрофагов; исследования в динамике эффекта лекарственной терапии; скрининга про- и противовоспалительных лекарственных инициаторов и ингибиторов свободнорадикальных процессов

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 06-04-48451, 06-04- и 05-04-49765-а и 08278-офи).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Parthasarathy S., Steinberg D., Witztum J.L. (1992) *Annu. Rev. Med.*, **43**, 219–225.
2. Takahashi K., Takeya M., Sakashita N. (2002) *Annu. Rev. Med.*, **35**(4), 179-203.
3. Биленко М.В., Хильченко А.В., Шмитько Н.А. (2003) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **135**, 410-413.
4. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1999) *Успехи соврем. биол.*, **119**, 461-474.
5. Bilenko M.V. (2001) Ischemia and reperfusion of various organs. Injury mechanisms, methods of prevention and treatment. (S. Boriotti and D. Denniss eds.), Nova Science Publishers, Inc. Huntington, New York.
6. Bilenko M.V., Khilchenko A.V., Nikitina N.A. (2004) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **37**, 242-243.



7. Биленко М.В., Хильченко А.В., Никитина Н.А., Аксёнов Д.В. (2008) Биомед. химия, **54**(3), 322-340.
8. Клебанов Г.И., Крейнина М., Позин В.М., Скуратовская С.Г., Почепцова Г.А. (1988) Бюлл. эксп. биол. мед., **106**, 297-299.
9. Филипов А.Е., Четкин А.В., Данильченко В.А., Данильченко В.В., Касьянов А.Н., Ващенко В.И. (2004) Terra Medica Nova, **1**(3), 33-37.
10. Uchiama M., Mihara M. (1978) Anal. Biochem., **86**, 271-278.
11. Morel D.W., Hessler J.R., Chisolm G.M. (1983) J. Lipid. Res., **24**, 1070-1076.
12. Nanda A., Grinstein S. (1991) Proc. Acad. Sci. USA **88**(23), 10816-10820.
13. Tohyama Y.I., Yamamura H. (2006) IUBMB Life **58**(5), 304-308.
14. Witztum J.L., Steinberg D. (1991) J. Clin. Invest., **88**(6), 1785-1792.
15. Lavy A., Brook G.J., Dankner G., Ben Amotz A., Aviram M. (1991) Metabolism, **40**, 794-799.
16. Handberg A., Levin K., Hojlund K., Beck-Nielsen H. (2006) Circulation, **114**, 1169-1176.
17. Kopprasch S., Pietzsch J., Graessler J. (2003) Luminescence, **18**(5), 268-273.
18. Воевода М.В., Рагино Ю.И., Семаева Е.В., Капитанова Е.В., Иванова М.В., Чернявский А.М., Никитин Ю.П. (2003) Бюллетень СО РАМН, **109**(3), 47-50.
19. Calvo D., Gómez-Coronado D., Suárez Y., Lasunción M.A., Vega M.A. (1998) J. Lipid Res., **39**(4), 777-788.
20. Hultén L.M., Ullström C., Krettek A., Van Reyk D., Marklund S.L., Dahlgren C., Wiklund O. (2005) Lipids Health Dis., **4**, 6-17.

Поступила: 23. 06. 2007.

#### PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES FROM THE BLOOD OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH IHD

*M.V. Bilenko<sup>1</sup>, Yu. A. Vladimirov<sup>2</sup>, S. A. Pavlova<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Thuy<sup>1</sup>, Tran Thi Hai Yen<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel: +007 495 246-6980; fax: +007 495 245-0857; e-mail: Marianna.Bilenko@mail.ru

<sup>2</sup>Faculty of Basic Medicine, Moscow State University, Moscow, Russia

Production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages from blood monocytes of healthy donors (MP<sub>N</sub>) and patients with IHD (MP<sub>IHD</sub>) before, during, and after their incubation with low-density lipoprotein (LDL) isolated from the blood plasma of healthy donors (LDL<sub>N</sub>) and patients with a high cholesterol level (LDL<sub>H</sub>) was estimated by the method of luminol-dependent and stimulated by opsonized zymosan (OZ) or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) chemiluminescence (CL). Intrinsic luminol-dependent, and zymosan - or PMA-stimulated chemiluminescence of MP<sub>IHD</sub> have exceeded the same types of chemiluminescence of MP<sub>N</sub> by factors of 1.4, 1.8, 2.7, and 1.6, respectively ( $p < 0.05-0.01$ ). The effect of zymosan on MP<sub>N</sub> and MP<sub>IHD</sub> was stronger than that of TPA by factors of 4.3 and 3.2, respectively, but manifested itself 2.5-3.0 times slower. LDL<sub>N</sub> and LDL<sub>H</sub> incubated with MP<sub>N</sub> during 15-60 min increased ROS production by a factor of 1.4 and 2.5 respectively, but influenced ROS production by MP<sub>IHD</sub> (as estimated by luminol-dependent chemiluminescence). Effects LDL<sub>N</sub> and LDL<sub>H</sub> on MP<sub>IHD</sub> were not detected at all. Repeated increase in zymosan-stimulated CL of MP<sub>N</sub> was also observed after their 15-180 min preincubation with LDL<sub>N</sub> and LDL<sub>H</sub> which followed after taking out LDL, washing MP<sub>N</sub> and adding Hanks' solution with opsonized zymosan. This increase was also stronger after MP<sub>N</sub> incubation with LDL<sub>H</sub> than after MP<sub>N</sub> incubation with LDL<sub>N</sub>, and no increase was observed in experiments with MP<sub>IHD</sub>. Thus, the results obtained by a chemiluminescent method showed that fresh macrophages from the blood of patients with IHD had higher ROS production than macrophages from healthy donors. LDL<sub>N</sub> and LDL<sub>H</sub> could exhibit primary and secondary (after preincubation) stimulating effect on CL in MP<sub>N</sub>; but had no effect on MP<sub>IHD</sub>. An analysis of macrophage chemiluminescence is a sensitive test for evaluation the degree of macrophage's stimulation and it may be effectively used for the dynamic control for treatment effectiveness in clinics.

**Key words:** human blood monocyte-derived macrophages, ROS, LDL, chemiluminescence, ischemic heart disease, atherosclerosis.