

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^{1}, Ю.А. Владимиров², С.А. Павлова¹,
Туй Нгуен Тхи Тху¹, Йен Чан Тхи Хай¹*

¹ГУ 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

²Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Продукция активных форм кислорода (АФК) макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_Н) и больных ИБС (МФ_{ИБС}) до, во время и после их совместной инкубации с ЛПНП, полученными из плазмы крови здоровых доноров (ЛПНП_Н) и людей с гиперхолестеринемией (ЛПНП_Г) 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_{ИБС} превышали те же виды ХЛ МФ_Н 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_Н) и в 3,2 раза (МФ_{ИБС}), но проявлялся в 2,5 – 3,0 раза медленнее. ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, инкубированные с МФ_Н, в первые 15 и 60 минут повышали люминол-зависимую ХЛ МФ_Н в 1,4 и 2,5 раза, соответственно, но не влияли на продукцию АФК в МФ_{ИБС}. После 15-180 минут преинкубации МФ_Н с ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, удаления ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, отмывки МФ и добавления среды Хенкса и ОЗ повторный рост ОЗ - активированной ХЛ МФ_Н был выражен сильнее при инкубации с ЛПНП_Г, чем с ЛПНП_Н, но отсутствовал в опытах с МФ_{ИБС}. Таким образом, выявлена более высокая интенсивность ХЛ макрофагов, полученных из крови больных ИБС, свидетельствующая об их стимуляции *in vivo*; доказана способность ЛПНП_Н и ЛПНП_Г первично и повторно (после преинкубации) усиливать ХЛ в МФ_Н, но не в МФ_{ИБС}. Сделан вывод о том, что ХЛ является чувствительным тестом на степень стимуляции макрофагов и может служить контролем за эффектом применяемой больным терапии.

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- α , IL 1-6, окЛПНП, АФК, ишемия и др.),

Список сокращений: АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПНП_Н – липопротеины низкой плотности, полученные из плазмы крови здоровых доноров; ЛПНП_Г – липопротеины низкой плотности, полученные из плазмы крови людей с гиперхолестеринемией; МФ – макрофаги, полученные из крови человека; МФ_Н – макрофаги, полученные из моноцитов крови здоровых доноров; МФ_{ИБС} – 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

ПРОДУКЦИЯ АФК МАКРОФАГАМИ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

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_{ИБС}), более активно окисляют и потребляют ЛПНП по сравнению с макрофагами из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_Н), 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_Н и МФ_{ИБС}) с помощью ХЛ метода, использованного до, во время и после инкубации макрофагов с ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, 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, натощак, 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-Raque 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 CO₂-инкубаторе ("Assab", Швеция) при 37°C в присутствии 95% воздуха и 5% CO₂ в условиях высокой влажности. ЛПНП (d = 1,019–1,065 г/мл) изолировали из плазмы крови 12 здоровых доноров (ЛПНП_Н, общий холестерин плазмы составлял 2,6-4,4 mM) и из плазмы крови 12 гиперхолестеринемичных пациентов (ЛПНП_Г, общий холестерин плазмы, составлял 6,2-8,54 mM) путем ультрацентрифугирования в градиентах NaBr + ЭДТА (первый градиент - d = 1,019, n²⁶_D = 1,3363; второй градиент - d = 1,065, n²⁶_D = 1,3445) два раза по 2 часа, при 111000 g в ультрацентрифуге L8-80 ("Beckman", США), снабженной Ti-90 ротором. ЛПНП_Н и ЛПНП_Г, 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_Н и МФ_{ИБС} перед добавлением ЛПНП_Н или ЛПНП_Г (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_Н или ЛПНП_Г среду “инкубации” не меняли. Для измерения ХЛ макрофагов после заданных сроков преинкубации МФ с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, “инкубации”, среду, содержащую ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, отсасывали, макрофаги отмывали PBS и в пробирки добавляли среду Хенкса.

Оценку ХЛ проводили на хемилюминометре 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-миристат-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_Н или ЛПНП_Г 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⁻¹×см⁻¹ [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 (± SEM) и критерия Стьюдента (t) для малых связанных выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Сравнительная оценка различных видов ХЛ в свежеприготовленных культурах МФ_Н и МФ_{ИБС} до их инкубации с ЛПНП_Н и ЛПНП_Г.

Активность ХЛ МФ_Н и МФ_{ИБС}, в зависимости от источника получения (вида) и количества клеток приведена в таблице. Из таблицы видно, что при количестве клеток, равном 200×10³, 400×10³ и 1000×10³, стимулированная ОЗ ХЛ МФ_{ИБС} превышала ХЛ того же количества МФ_Н в 4,3, 2,5 и 3,5 раза, соответственно (во всех случаях ^{##}p<0,01). Количество клеток, равное 400×10³, являлось величиной достаточно чувствительной и в то же время достоверно отличающейся от предыдущего и последующего количества клеток. Вследствие этого количество МФ, равное 400×10³, было использовано в последующих опытах.

Таблица. Зависимость ХЛ от вида и количества макрофагов.

Вид МФ	Количество МФ и активность ХЛ (V) ¹			
	100×10 ³	200×10 ³	400×10 ³	1000×10 ³
МФ _Н	0,9 ± 0,29	3,4 ± 0,85	9,7 ± 1,91*	19,9±8,26*
МФ _{ИБС}	5,1 ± 1,27	14,5±3,43 ^{###}	23,83±2,65 ^{***##}	69,7 ± 0,327 ^{***##}

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_{ИБС} и МФ_Н при использовании одинакового количества клеток, ## - p<0,01; ¹ - 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_Н, и МФ_{ИБС}, взятых в количестве 400×10³, 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_Н 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_{ИБС} соответственно, превышая ХЛ в МФ_Н в 1,4, 1,8, 2,7 и 1,6 раза (^{###}p<0,05, p<0,01). Коэффициенты люминол-зависимой ХЛ МФ_Н и МФ_{ИБС} составляли 5,9 и 7,4 (^op<0,01), коэффициенты ФМА стимулированной ХЛ составляли 10,5 и 12,1 (^op<0,01), коэффициенты зимозан активированной ХЛ - 44,8 и 38,4 (^op<0,01) для МФ_Н и МФ_{ИБС} соответственно.

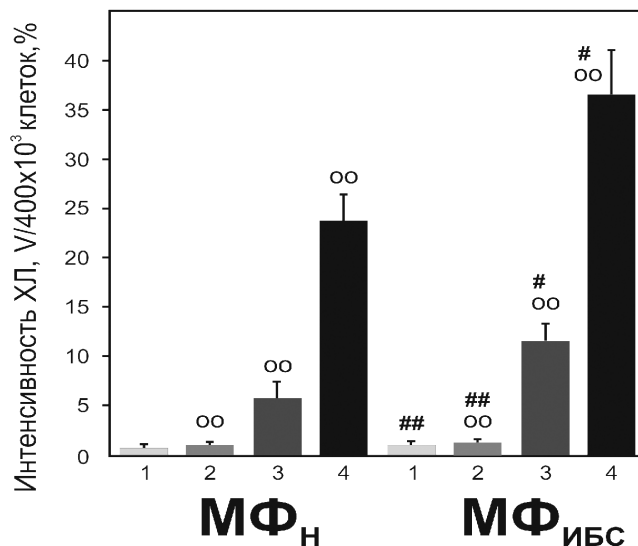


Рисунок 1.

Сравнение интенсивности собственной (1), люминол-зависимой (2), стимулированной ФМА (3) или зимозаном (4) хемилюминесценции макрофагов от здоровых доноров (МФ_Н) и больных ИБС (МФ_{ИБС}) 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_Н и МФ_{ИБС}: o - p <0,05; oo - p<0,01. Число независимых опытов (n) равно 6.

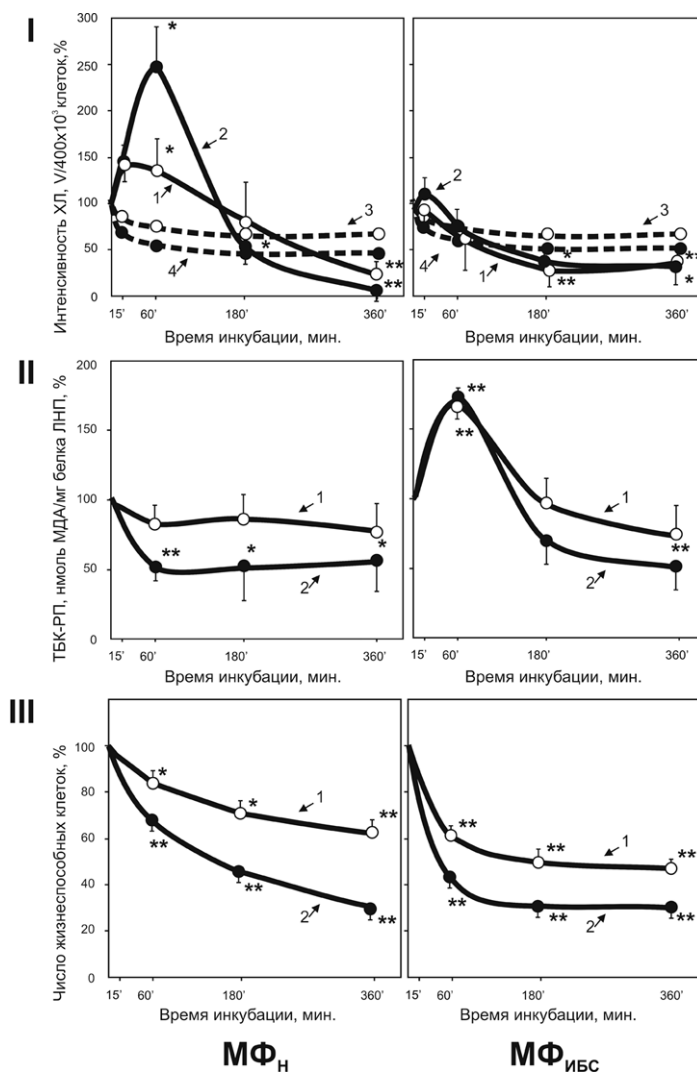
ОЗ в использованной концентрации (0,1 мкг/мл) являлся более сильным стимулятором как МФ_Н, так и МФ_{ИБС}, по сравнению с ФМА (1 нг/мл). В то же время ФМА даже в меньшей дозе вызывал более быстрый максимальный подъем кривой ХЛ (в течение 10-12 минут), по сравнению с ОЗ (в течение 30-40 минут).

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 Ca²⁺ [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 Ca²⁺, 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_Н и МФ_{ИБС} в процессе 15–360 минут их совместной инкубации с ЛПНП_Н (1) и ЛПНП_Г (2); сопоставление ХЛ со степенью окислительной модификации ЛПНП и жизнеспособностью макрофагов.

Данные второй части исследования представлены на рисунке 2. Видно, что ЛПНП_Н (I, 3) и ЛПНП_Г (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_Н и МФ_{ИБС} до добавления ЛПНП_Н или ЛПНП_Г вызывали более выраженную люминол-зависимую ХЛ, равную

0,25±0,04 и 1,08±0,23 V, соответственно, эти величины были приняты за контроль (100%). При добавлении ЛПНП_H или ЛПНП_Г к среде, содержащей МФ_H, 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_H коэффициенты ЛПНП_H и ЛПНП_Г стимулированной ХЛ составляли 1,4 и 2,5 соответственно. Совместная инкубация ЛПНП_H или ЛПНП_Г с МФ_{ИБС} в течение 15–60 минут люминол-зависимой ХЛ достоверно не меняла, то есть в отличие от МФ_H для МФ_{ИБС} коэффициенты ЛПНП_H и ЛПНП_Г стимулированной ХЛ были равны нулю.



ПРОДУКЦИЯ АФК МАКРОФАГАМИ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИБС

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

Таким образом, совместная инкубация МФ_Н или МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г выявила раннюю, но кратковременную активацию АФК-продуцирующей функции лишь МФ_Н. При этом ЛПНП_Г вызывали более выраженное усиление ХЛ макрофагов, чем ЛПНП_Н, что, видимо, связано с изначально более высокой окисленностью ЛПНП_Г [15], и вследствие этого, их более сильным активирующим действием на макрофаги [16, 17].

Отсутствие роста люминол-зависимой ХЛ у МФ_{ИБС} под влиянием как ЛПНП_Н, так и ЛПНП_Г, сочеталось с ранее выявленным [7] увеличением количества ТБК-РП в ЛПНП, которое в течение первых 60 минут совместной инкубации МФ_{ИБС} и с ЛПНП_Н, и, особенно, с ЛПНП_Г было выше исходного в 1,6 и 1,7 раза (рис. 2, II, $**p < 0,01$). Таким образом, результаты люминол-зависимой ХЛ МФ_{ИБС} и продукции ТБК-РП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г имели обратную направленность, что может быть обусловлено быстрым присоединением АФК к ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, а также меньшей устойчивостью ЛПНП_Г к окислению, в связи со сниженным в них содержанием витаминов А и Е [18]. С другой стороны, не исключено, что отсутствие стимулирующего действия ЛПНП_Н или ЛПНП_Г на люминол-зависимую ХЛ МФ_{ИБС} может быть опосредовано наличием на поверхности уже активированных *in vivo* макрофагов скавэнджер рецепторов, приводящих к захвату как ЛПНП_Г, так и ЛПНП_Н [19]. Неограниченное потребление с помощью скавэнджер рецепторов ЛПНП_Г макрофагами, полученными от больных ИБС, а также способность этих рецепторов к частичному потреблению и ЛПНП_Н [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_Н или ЛПНП_Г, согласно нашим данным, приведенным в работе [7] снижалось в опытах с МФ_Н - в 1,2 и 1,5 раза ($***p < 0,05-0,01$), а в опытах с МФ_{ИБС} - 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_Н, так и в МФ_{ИБС} на поздних (через 360 минут) сроках их инкубации с ЛПНП_Н и с ЛПНП_Г, может зависеть и от резкого снижения количества жизнеспособных макрофагов.

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

3. Сравнительная оценка интенсивности стимулированной зимозаном ХЛ МФ_Н и МФ_{ИБС} после 15–360 минут их преинкубации с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г.

Данные третьей части исследования представлены на рисунке 3. Величина ОЗ-стимулированной ХЛ контрольных МФ_Н и МФ_{ИБС} 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_Н и МФ_{ИБС} в процессе 15–360 минут инкубации (рис. 3, линия 3) умеренно, но недостоверно снижалась.

Преинкубацию МФ_Н и МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г 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).

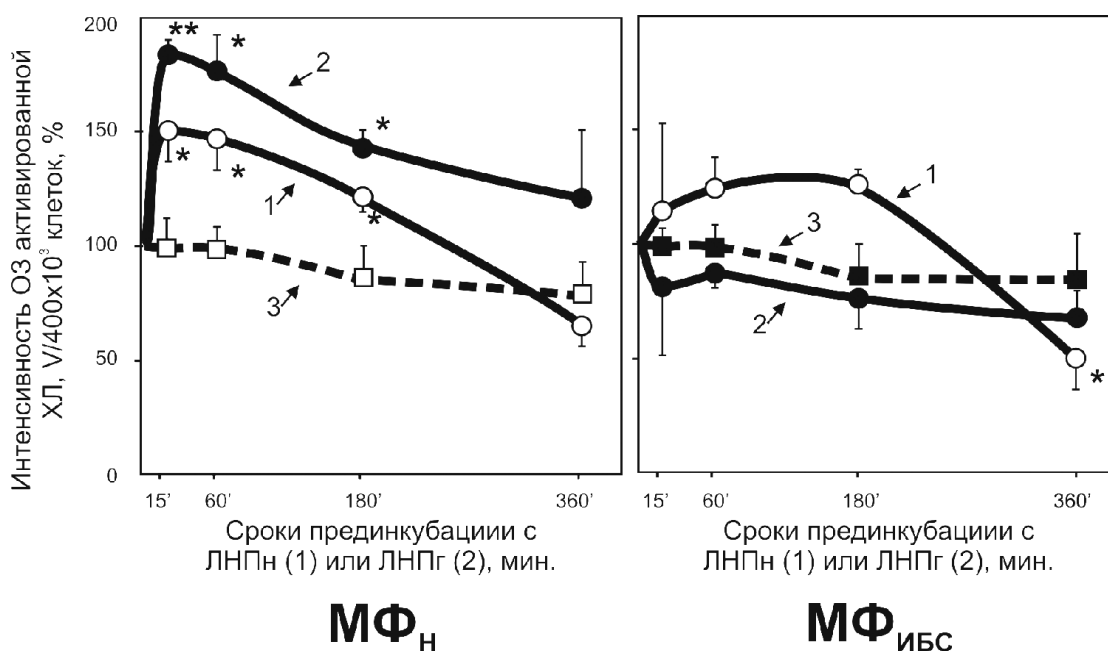


Рисунок 3.

Оценка интенсивности стимулированной зимозаном ХЛ макрофагов от здоровых доноров (МФ_Н) и больных ИБС (МФ_{ИБС}) после преинкубации клеток в течение 15 – 360 минут с ЛПНП_Н (1) или ЛПНП_Г (2) ($V/400 \times 10^3$ клеток, %).

Примечание: После преинкубации макрофагов ЛПНП_Н или ЛПНП_Г 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_Н после 15, 60 и 180 мин их преинкубации с ЛПНП_Н ОЗ-стимулированная повторная ХЛ возрастала в 1,5, 1,5 и 1,2 раза; после преинкубации с ЛПНП_Г - 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_{ИБС} достоверного изменения повторной, ОЗ-стимулированной ХЛ, в пробах, сначала подвергнутых преинкубации с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, выявлено не было. К 360 минутам в пробах с ЛПНП_Н наблюдалось умеренное, а в пробах с ЛПНП_Г - выраженное снижение ОЗ-стимулированной ХЛ в обоих видах макрофагов.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведена сравнительная оценка способности свежеполученной культуры МФ_Н и МФ_{ИБС} продуцировать АФК спонтанно, а также под влиянием люминола, опсонизированного зимозана, форбол-13-миристан-12-ацетата и липопротеинов низкой плотности, полученных из крови здоровых доноров (ЛПНП_Н) и людей с гиперхолестеринемией (ЛПНП_Г).

Показано, что стимулированная ХЛ зависит от числа исследуемых макрофагов и может характеризовать количество жизнеспособных клеток в пробе; все виды ХЛ в МФ_{ИБС} при одинаковом числе клеток (400×10^3) были достоверно выше ($p < 0,05-0,01$), чем те же виды ХЛ в МФ_Н: собственная и люминол-зависимая ХЛ в МФ_{ИБС} 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_Н или ЛПНП_Г с МФ_Н 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_Н или ЛПНП_Г с МФ_{ИБС} роста ХЛ не вызывала, а вела к ее постепенному снижению.

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

ВЫВОДЫ:

1) Собственная, люминол-зависимая и стимулированная (ОЗ или ФМА) ХЛ 20-ти часовой культуры макрофагов, полученных из моноцитов крови больных ИБС (МФ_{ИБС}) *in vitro* достоверно выше, чем те же виды ХЛ культуры макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров (МФ_Н).

2) Совместная инкубация 20-ти часовой культуры МФ_Н с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г в течение 15 и 60 минут сопровождается усилением люминол-зависимой ХЛ МФ_Н, при этом ЛПНП_Г обладают более выраженным стимулирующим эффектом, чем ЛПНП_Н. Совместная инкубация МФ_{ИБС} с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г усиления люминол-зависимой ХЛ не вызывает, но, в отличие от МФ_Н, сопровождается ростом ТБК-РП в ЛПНП_Н и ЛПНП_Г и более выраженным снижением количества жизнеспособных МФ_{ИБС}.

3) Преинкубация МФ_Н с ЛПНП_Н и, особенно, с ЛПНП_Г в течение 15, 60 и 180 минут с последующим удалением ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, отмыванием макрофагов и добавлением ОЗ способна в 1,5 (ЛПНП_Н) и в 1,8 (ЛПНП_Г) раз усилить вторичную активированную зимозаном ХЛ ($p < 0,05-0,01$). МФ_{ИБС} после преинкубации с ЛПНП_Н или ЛПНП_Г, удаления ЛПНП_Н и ЛПНП_Г 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, 06-04-05-04-49765-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. Bilenko¹, Yu. A. Vladimirov², S. A. Pavlova¹, Nguyen Thi Thu Thuy¹, Tran Thi Hai Yen¹

¹Orekhovich 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

²Faculty of Basic Medicine, Moscow State University, Moscow, Russia

Production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages from blood monocytes of healthy donors (MP_N) and patients with IHD (MP_{IHD}) before, during, and after their incubation with low-density lipoprotein (LDL) isolated from the blood plasma of healthy donors (LDL_N) and patients with a high cholesterol level (LDL_H) 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_{IHD} have exceeded the same types of chemiluminescence of MP_N by factors of 1.4, 1.8, 2.7, and 1.6, respectively (p<0.05-0.01). The effect of zymosan on MP_N and MP_{IHD} 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_N and LDL_H incubated with MP_N during 15-60 min increased ROS production by a factor of 1.4 and 2.5 respectively, but influenced ROS production by MP_{IHD} (as estimated by luminol-dependent chemiluminescence). Effects LDL_N and LDL_H on MP_{IHD} were not detected at all. Repeated increase in zymosan-stimulated CL of MP_N was also observed after their 15-180 min preincubation with LDL_N and LDL_H which followed after taking out LDL, washing MP_N and adding Hanks' solution with opsonized zymosan. This increase was also stronger after MP_N incubation with LDL_H than after MP_N incubation with LDL_N, and no increase was observed in experiments with MP_{IHD}. 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_N and LDL_H could exhibit primary and secondary (after preincubation) stimulating effect on CL in MP_N; but had no effect on MP_{IHD}. 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.