

БИОЛОГИЯ

УДК 576.3

НАРУШЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАНОРАЗМЕРНЫХ ФЛУОРОФОРОВ

© 2010 г. С.Н. Плескова^{1,2}, Э.Р. Михеева^{1,2}, Е.Н. Горшкова¹, А.Е. Хомутов¹

¹ Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

² Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева

pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2010

Определяются нарушения в ферментативной активности нейтрофильных гранулоцитов под влиянием полупроводниковых квантовых точек и наноразмерного флуоресцирующего порошка Er/Yb. Зафиксированы незначительные изменения активности одного из центральных ферментов антимикробной защиты нейтрофила – миелопероксидазы и сдвиги среднего цитохимического коэффициента, отражающего активацию лизосомально-катионных белков.

Ключевые слова: нейтрофильный гранулоцит, миелопероксидаза, лизосомально-катионные белки, квантовые точки, нанопорошок.

Введение

Развитие нанотехнологии и синтез наноразмерных материалов приводят к появлению ксенобиотиков с принципиально новыми свойствами [1–3]. Вещества наноразмерного диапазона внедряются и в области исследования биологических закономерностей, и в области доклинического применения (тестируются в качестве диагностикумов и терапевтических агентов) [4, 5]. К весомым преимуществам флуорофоров нового поколения следует отнести высокую контрастность и высокий квантовый выход; малые размеры и, в связи с этим, быструю фармакокинетику; возможность конъюгации с биомолекулами для создания систем адресной доставки; возможность управления такими характеристиками, как поглощение/рассеивание [6, 7]. Вместе с тем накапливается все больше сведений о токсичности наноматериалов [8, 9]. Это привело к созданию нового направления биомедицины – нанотоксикологии. Прежде всего, для адекватной оценки перспективности использования наноматериалов в целях решения биологических и медицинских проблем необходимо оценить их влияние на состояние неспецифической резистентности организма, поскольку этот барьер доиммунной защиты в первую очередь контактирует с ксенобиотиками различного ти-

па и происхождения. Одним из основных клеточных факторов системы неспецифической резистентности является нейтрофильный гранулоцит. Целью представленной работы было определение биохимических сдвигов в активности ферментов нейтрофилов под влиянием наноразмерных флуорофоров.

Экспериментальная часть

Нейтрофильные гранулоциты получали из венозной крови здоровых доноров. Гепаринизированную кровь, разведенную забуференным физиологическим раствором (ЗФР), наносили на двойной градиент фикола-урографина и центрифугировали (200 г, 40 мин). Нейтрофильную фракцию дважды отмывали (200 г, 3 мин) и взвешивали в ЗФР в конечной концентрации $2 \cdot 10^9$ кл/мл [10].

В качестве наноразмерных материалов, влияющих на биохимический статус нейтрофильных гранулоцитов, использовали: 1) квантовые точки разных составов: CdSe/ZnS-меркаптопропионовая кислота (МПК); (CdSe/CdZnS)/ZnS-polyT; CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂, синтезированные ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна» (Дмитров, Россия) и 2) нанопорошок, у которого в качестве излучающего центра используются ионы Er, а в качестве сенсibilизатора –

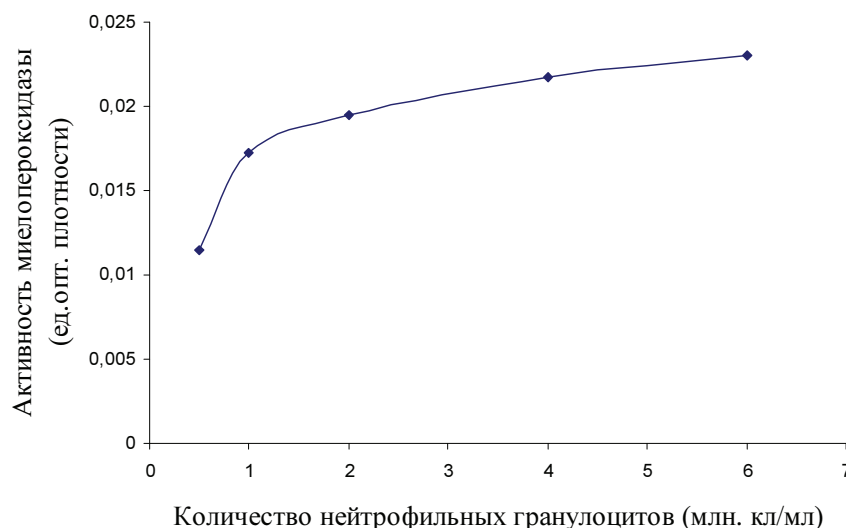


Рис. 1. Кривая зависимости активности миелопероксидазы от количества разрушенных нейтрофилов

ионы Yb, синтезированный на базе НИФТИ ННГУ им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород). Квантовые точки использовали в конечной концентрации 0,1 мг/мл, а нанопорошок – в двух рабочих концентрациях $8 \cdot 10^{-5}$ мМ и $1 \cdot 10^{-3}$ мМ.

Активность миелопероксидазы (МПО) в клеточных субстратах тестировали спектрофотометрическим методом в собственной модификации. Для оценки влияния наноразмерных флуорофоров на нейтрофильные гранулоциты их инкубировали с клетками до проведения теста на миелопероксидазу (37°C , 30 мин). Клеточный супернатант получали, инкубируя нейтрофильные гранулоциты с Тритоном X 100 (24°C , 20 мин), затем отбирали 100 мкл надосадка и разводили его в соотношении 1:20 субстратным буфером с раствором хромофора (ТМБ) и инкубировали (37°C , 15 мин). Реакцию останавливали стоп-реагентом (100 мкл, 0,5 М H_2SO_4). Оптическая плотность измерялась при $\lambda = 450$ нм на спектрофотометре UV-1700 (*Shimadzu*, Япония).

Лизосомально-катионный тест проводили по методу Пигаревского. Для определения воздействия наноразмерных флуорофоров на состояние лизосомально-катионных белков проводили инкубацию наноматериалов с нейтрофильными гранулоцитами (37°C , 60 мин) [11].

Анализ полученных результатов производили в пакете *Origin 5,0 Server*.

Результаты и их обсуждение

Для количественной характеристики МПО была построена кривая, отражающая зависимость активности фермента от количества взятых в эксперимент нейтрофильных гранулоци-

тов. Кривая представлена на рис. 1. Из анализа кривой следует, что в эксперимент нужно брать клетки в конечной концентрации $2 \cdot 10^9$ кл/мл, поскольку именно при таком количестве активность фермента наиболее чувствительна и плавно изменяется как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

Нейтрофильные гранулоциты (конечная концентрация $2 \cdot 10^9$ кл/мл) инкубировали с квантовыми точками разного состава или с наноразмерным порошком Er/Yb (37°C , 30 мин). Результаты экспериментов представлены в таблице.

Из представленной таблицы следует, что наноразмерные флуорофоры мало влияют на миелопероксидазу нейтрофильных гранулоцитов. Только один тип квантовых точек CdSeCdS₂ZnS/polyT/SiO₂-NH₂ приводил к статистически значимому снижению ферментативной активности, остальные квантовые точки вызывали только тенденцию к снижению, а для нанопорошка Er/Yb изменения активности вообще не регистрируются. Полученные результаты являются достаточно благоприятными для общей оценки токсического влияния наноразмерных флуорофоров на нейтрофильные гранулоциты, поскольку именно активность этого фермента является маркером целого ряда инфекционных и неинфекционных патологий. В частности отмечается, что количество и активность фермента значительно возрастают при тяжелых пиогенных инфекциях (сепсис, перитонит, пневмония) [12]. Миелопероксидаза является предикативным признаком тяжелых кардиоваскулярных осложнений [13]. Снижение активности миелопероксидазы указывает на развитие деструктивных процессов (ревматиз-

Изменения активности миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов под влиянием наноразмерных флуорофоров

Наименование альтерирующего агента	Активность миелопероксидазы $2 \cdot 10^9$ нейтрофильных гранулоцитов (ед. опт. плотности)
Контроль	0.02 ± 0.008
CdSe/ZnS-МПК	0.0141 ± 0.012 ($t = 1.082$; $n = 14$; $p > 0.05$)
(CdSe/CdZnS)ZnS-polyT	0.0153 ± 0.01 ($t = 0.968$; $n = 16$; $p > 0.05$)
CdSeCdSZnS/polyT/SiO ₂ -NH ₂	0.007 ± 0.005 ($t = 2.83$; $n = 12$; $p < 0.05$)*
Нанопорошок Er/Yb в концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ мМ	0.02 ± 0.017 ($t = 0$; $n = 16$; $p > 0.05$)
Нанопорошок Er/Yb в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ мМ	0.021 ± 0.013 ($t = 0.182$; $n = 14$; $p > 0.05$)

* Различия с контролем статистически значимы ($p < 0.05$).

ма, ревматоидного артрита, деструктивного аппендицита, вторичного амилоидоза) [14].

Вместе с тем отсутствие существенного влияния со стороны наноразмерных флуорофоров на активность миелопероксидазы может указывать не на их слабое возмущающее физиологическое действие, а на то, что миелопероксидаза, являясь маркером клинических патологий, не является адекватным показателем для оценки токсичности наноматериалов.

Среди цитохимических тестов большая роль отводится лизосомально-катионному тесту. Он отражает секреторную дегрануляцию активированных нейтрофильных гранулоцитов, являясь чувствительным индикатором патологии.

Результаты лизосомально-катионного теста продемонстрировали, что в контроле показатели среднего цитохимического коэффициента (СЦК) составили 1.37 ± 0.7 , после инкубации с наноматериалами наблюдается статистически значимое снижение СЦК. СЦК для CdSe/ZnS-МПК составил 0.89 ± 0.68 ($t = 11.94$; $n = 1200$; $p < 0.05$), для (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT – 0.88 ± 0.62 ($t = 12.52$; $n = 1200$; $p < 0.05$); для CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ – 0.98 ± 0.6 ($t = 11.94$; $n = 1200$; $p < 0.05$) и для нанопорошка Er/Yb в концентрации $8 \cdot 10^{-5}$ мМ – 0.85 ± 0.61 ($t = 13.66$; $n = 1198$; $p < 0.05$), а в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ мМ – 0.83 ± 0.58 ($t = 13.66$; $n = 1198$; $p < 0.05$).

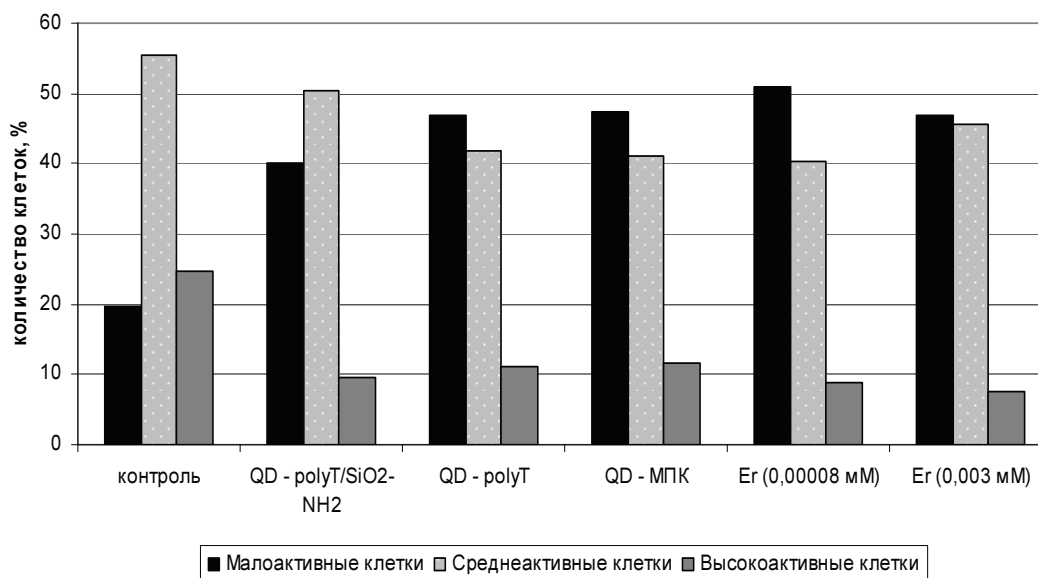


Рис. 2. Процентное распределение клеток с разной активностью гранул (просчитано 3 175 клеток). Активность лизосомально-катионных белков оценивалась по интенсивности окрашивания гранул: малоактивными признавались клетки с отсутствием окрашенных гранул в цитоплазме или единичными светло-зелеными гранулами; среднеактивными считали клетки, заполненные светло-зелеными гранулами; как высокоактивные определяли клетки, заполненные темно-зелеными гранулами

Таким образом, отмечается существенное нарушение в бактерицидной системе нейтрофильных гранулоцитов под влиянием наноразмерных флуорофоров. Функциональные резервы нейтрофильного фагоцитоза можно оценить по числу высокоактивных гранул. Результаты распределения гранул по активности представлены на рис. 2.

Рисунок наглядно демонстрирует, что инкубация нейтрофильных гранулоцитов с наноразмерными флуорофорами на фоне незначительного снижения числа среднеактивных клеток приводит к существенному падению числа высокоактивных клеток и значительному возрастанию числа низкоактивных. Таким образом, результаты приведенного распределения доказывают истощение биоцидного фагоцитарного резерва нейтрофильных гранулоцитов под влиянием квантовых точек и нанопорошка Er/Yb.

Выводы

1. Построенная кривая зависимости активности миелопероксидазы от количества разрушенных клеток показывает, что лучшей рабочей концентрацией нейтрофильных гранулоцитов для определения активности фермента является концентрация $2 \cdot 10^9$ кл/мл.

2. Тест на определение активности миелопероксидазы не является информативным для определения цитотоксических эффектов наноразмерных флуорофоров в отношении нейтрофильных гранулоцитов.

3. Квантовые точки, коровая часть которых защищена функционализированным покрытием $\text{polyT/SiO}_2\text{-NH}_2$, вызывали статистически значимое снижение активности миелопероксидазы.

4. Инкубация квантовых точек и нанопорошка Er/Yb с нейтрофильными гранулоцитами в течение 60 мин вызывала статистически значимое снижение среднего цитохимического коэффициента в лизосомально-катионном тесте. Диспропорция отмечалась и в распределении

клеток по функциональной активности: и квантовые точки, и нанопорошок вызывают существенное снижение числа высокоактивных клеток с одновременным увеличением числа низкоактивных.

Авторы выражают признательность Брилкиной А.А. за помощь в работе со спектрофотометром и Шушунову А.Н., синтезировавшему нанопорошок Er/Yb.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-97068-р_поволжье_а).

Список литературы

1. Яшин К.Д., Осипович В.С., Пицук С.Е. // Доклады БГУИР. 2007. № 3. С. 74–79.
2. Soloviev M. // Journal of Nanobiotechnology. 2007. V. 5. P. 1477–1500.
3. Tomlinson I.D., Gray J.L., Rosental S.J. // Molecules. 2002. V. 7. P. 777–790.
4. Manzoor K., Johnny S., Thomas D., Setua S. et al. // Nanotechnology. 2009. V. 20. P. 65102–65115.
5. Yu W.W., Chang E., Drezek R., Colvin V.L. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006. V. 348. P. 781–786.
6. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2. С. 160–173.
7. Jaiswal J.K., Simon S.M. // Methods in Molecular Biology. 2007. V. 374. P. 93–104.
8. Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // Science. 2006. V. 311. P. 622–627.
9. Shiohara A., Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., Yamamoto K. // Microbiol. Immunol. 2004. V. 48. P. 669–675.
10. Подосинников И.В., Нилова Л.Г., Бабичев И.В. // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 68–70.
11. Пигаревский В.Е. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Ленинград, 1988. С. 87–101.
12. Filep J.G., Kebir D.E. Handbook of Granulocytes. NY.: Nova Science Publishers, 2009. P. 229–247.
13. Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M. et al. // Circulation. 2003. V. 108. P. 1440–1445.
14. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф, 1993. 192 с.

ALTERATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES ENZYMATIC ACTIVITY UNDER THE INFLUENCE OF NANOSIZED FLUOROPHORES

S.N. Pleskova, E.R. Mikheeva, E.N. Gorshkova, A.E. Khomutov

Some changes in the enzymatic activity of neutrophil granulocytes under the influence of semiconductor quantum dots and Er/Yb fluorescent nanopowder have been determined. Insignificant changes in mieloperoxidase, one of the central enzymes in antimicrobial protection, have been observed. Some shifts of the average cytochemical coefficient, which is the evidence of lysosomal-cation proteins activation, have been established.

Keywords: neutrophil granulocytes, mieloperoxidase, lysosomal-cation proteins, quantum dots, nanopowder.