

мировыми показателями (например, в Японии, где смертность при САК аневризматической этиологии составляет до 27 %).

Заключение. Выключение аневризмы из кровотока является единственной лечебной модальностью, предотвращающей её повторный разрыв. Факторами, определяющими летальный исход САК, являются: сроки обращения в специализирован-

ное лечебное учреждение, высокая степень показателей по Hunt – Hess, ВЖК 5–6 баллов по шкале GRAEB, развитие выраженного распространенного вазоспазма. Применение химиоангиопластики является эффективным и безопасным методом, который позволяет значительно снизить летальность пациентов с аневризматическим субарахноидальным кровоизлиянием.

Литература

1. Слетов, А. А. Хирургическое лечение опухолей краниовертебральной локализации / А. А. Слетов, В. В. Елисейев, Д. В. Панченко, Р. А. Можейко // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 231.
2. Fisher, C. M. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning / C. M. Fisher // *Neurosurgery*. – 1980. – Vol. 6, № 1. – P. 1–9.

References

1. Sletov A. A., Yeliseyev V. V., Panchenko D. V., Mozheyko R. A. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. – Modern problems of science and education. 2015;3:231.
2. Fisher C. M. *Neurosurgery*. 1980;6(1):1-9.

3. Meyer, F. B. *Atlas of Neurosurgery (Basic approaches to cranial and vascular procedures)* / F. B. Meyer. – Philadelphia : Nasher, 1998.
4. Yasargil, M. G. *Microneurosurgery* / M. G. Yasargil. – Vol. 1-2. – Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 1984.
5. Yonekawahawa, Y. *Operative neurosurgery. (Personal and historical backgrounds)* / Y. Yonekawahawa // *No Shinkei. Geka*. – 2013. – Vol. 35, № 7. – P. 703–718.

3. Meyer, F. B. *Atlas of Neurosurgery (Basic approaches to cranial and vascular procedures)*. Philadelphia Nasher; 1998.
4. Yasargil M. G. *Microneurosurgery*. New York: «Georg Thieme Verlag»; 1984.
5. Yonekawahawa Y. *No Shinkei. Geka*. 2013;35(7):703-718.

Сведения об авторах:

Белоконь Олег Сергеевич, врач по рентгенэндоваскулярным методам диагностики и лечения; тел.: (8652)356941; e-mail: bos-ol@yandex.ru

Можейко Ростислав Александрович, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, главный нейрохирург министерства здравоохранения Ставропольского края; тел.: (8652)350223; e-mail: rost-m@rambler.ru

Слетов Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии; тел.: (8652)553878; e-mail: dr.sletov-aleksandr@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2016

УДК 615.856:612.112:616-066.04]-092.4

DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2016.11007>

ISSN – 2073-8137

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Е. Ю. Златник, Г. И. Закора, Е. М. Непомнящая

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-Дону, Россия

EFFECT OF MODULATION ON IMMUNOCYTES` ACTIVITY OF ONCOLOGIC PATIENTS BY BIOGENIC METALS` NANOPARTICLES

Zlatnik E. Yu., Zakora G. I., Nepomnyashchaya E. M.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Изучено действие наночастиц биогенных металлов (НЧ Fe, НЧ Zn) на функциональное состояние клеток врожденного и адаптивного иммунитета онкологических больных при инкубации *in vitro*. С помощью иммунологических (иммуноферментного, иммунофлюоресцентного, цитотоксического, восстановления нитросинего тетразолия) методов определено влияние НЧ на функциональную активность нейтрофилов, натуральных киллеров, экспрессию моноцитарных мембранных рецепторов, продукцию моно- и лимфокинов. Повреждающего действия НЧ на клетки фагоцитарного, Т- и NK-клеточного звеньев иммунной системы не выявлено. Обнаружена стимулирующая экспрессии рецепторов HLA-DR на моноцитах, цитотоксичности NK-клеток при действии НЧ Fe, модулирующее влияние на продукцию монокинов TNF- α и IL-1 α обоих видов НЧ. НЧ Fe более активно стимулировали клетки фагоцитарного звена по сравнению с НЧ Zn. Таким образом, установлено влияние НЧ

биоге́нных металлов *in vitro* на некоторые фенотипические и функциональные характеристики иммунокомпетентных клеток в виде модуляции активности нейтрофилов, моноцитов и естественных киллеров.

Ключевые слова: наночастицы биоге́нных металлов, иммунокомпетентные клетки, функциональная активность

The aim of the study was to assess the *in vitro* effects of biogenic metals' nanoparticles (NP Fe, NP Zn) on the activity of cells mediating innate and adaptive immunity in cancer patients. Immunologic methods (immunofluorescent, cytotoxic, ELISA, NBT tests) were used to find out any influence of incubation with NP on functional activity, receptors' expression, production of monokines and lymphokines by blood mononuclear cells in patients with malignant tumors. No obvious injury of T-cells, NK-cells and phagocytes was noted. At the same time stimulation of monocytes' HLA-DR expression and NK-cells' cytotoxicity was observed after incubation with NP Fe, while incubation with both NP Fe and NP Zn induced modulating effect on TNF- α and IL-1 α production. Incubation with NP Fe resulted in more active stimulation of phagocytes than incubation with NP Zn. Thus, we found positive *in vitro* effect of biogenic metals' nanoparticles on some phenotypic and functional properties of immune cells, i.e. modulation of neutrophils, monocytes and natural killers' activities.

Key words: nanoparticles of biogenic metals, immunocytes, functional activity

В рамках активно развивающихся нанотехнологий разрабатываются наноразмерные частицы, в том числе на основе металлов. Изучение их биологических эффектов с целью определения возможных областей применения является актуальной задачей современной биологии и медицины [4, 5, 10]. Обнаружены противоопухолевые эффекты металлических наноразмерных частиц, полученных на основе биоге́нных металлов, которые входят в состав биологических макромолекул и участвуют в обменных процессах.

Состояние иммунной системы играет важную роль в индукции эффективного противоопухолевого ответа, поэтому оценка влияния металлических наночастиц на иммунокомпетентные клетки представляет существенный теоретический и прикладной интерес. Иммуномодулирующие свойства металлов хорошо известны и описаны в литературе [3], но большая часть этих данных относится к металлам, поступающим с пищей и всасывающимся в кишечнике.

Опубликованные нами ранее результаты культуральных и экспериментальных исследований позволили установить выраженные антипролиферативные свойства наночастиц (НЧ) биоге́нных металлов (Cu, Zn, Fe) при локальном (интра- и паратуморальном) введении [1, 2]. Представляет интерес исследование возможных иммуотропных свойств этих НЧ на различных моделях, например, при инкубации с иммунокомпетентными клетками. С учетом того, что инкубация с НЧ может привести к разрушению иммуноцитов, к стимуляции или ингибированию их функциональной активности, такое исследование позволит судить о возможном вкладе клеток в противоопухолевый эффект, может представлять отдельную область применения металлических НЧ.

Целью данной работы явилось изучение действия НЧ биоге́нных металлов на функциональное состояние клеток врожденного и адаптивного иммунитета онкологических больных при инкубации *in vitro*. При этом проводилось изучение влияния НЧ на функциональную активность нейтрофилов, экспрессию моноцитарных мембранных рецепторов, функциональную активность натуральных киллеров, на продукцию моно- и лимфокинов мононуклеарными клетками крови.

Материал и методы. В работе были использованы НЧ сферической формы (размер 40–100 нм), представляющие собой ультрадисперсные порош-

ки переходных биоге́нных металлов (Zn, Fe), способ получения и физические характеристики которых описаны ранее [8]. Использовали концентрацию НЧ 1 мкг/мл в физиологическом растворе, ранее продемонстрировавшую антипролиферативное действие на опухолевые клетки; в ряде опытов брали также концентрацию 0,01 мг/мл. В контрольные пробы добавляли эквивалентный объем среды 199.

Для оценки влияния НЧ на различные иммунокомпетентные клетки (моноциты, лимфоциты, нейтрофилы) применяли общепринятые методы: непрямой иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа (ИФА), восстановления нитросинового тетразолия (НСТ-тест), цитотоксический тест (ЦТТ).

Для постановки спонтанного и стимулированного латексом НСТ-теста в нейтрофилах использовали цельную кровь, для остальных реакций из венозной крови онкологических больных выделяли мононуклеарные клетки (МНК) в градиенте плотности фиколлаверографина ($\rho=1,077-1,078$). К 1 мл взвеси клеток в концентрации $3-4 \times 10^6$ /мл добавляли по 100 мкл взвеси НЧ, обработанных *ex tempore* ультразвуком для предотвращения агрегации, инкубировали, трижды осаждали средой 199. В зависимости от необходимого времени инкубации экспозиция клеток с НЧ была различной: для тестов НСТ и иммунофлуоресценции она составляла 30 мин при 37 °С. Перед постановкой ЦТТ выделенные МНК инкубировали с НЧ таким же образом, осаждали средой 199 и использовали в виде клеточ-эффекторов; в качестве клеточ-мишеней использовали клетки эритромиелоэза человека K562, культивируемые в полной среде, содержащей RPMI-1640 с 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ буфера HEPES, 50 мкг/мл гентамицина [7]. Соотношение клеточ-мишеней и клеточ-эффекторов составляло 1:20, их совместная инкубация проводилась в течение 24 часов при 37 °С в присутствии 5 % CO₂, после чего определяли процент погибших клеточ-мишеней по способности окрашиваться трипановым синим.

Для оценки влияния НЧ биоге́нных металлов на продукцию цитокинов проводили 24-часовое культивирование МНК с НЧ и без них в полной культуральной среде, после чего в супернатантах определяли содержание TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 методом ИФА с тест-системами фирм «Вектор-Бест» (Новосибирск) и «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Результаты иммунофлуоресцентного теста выражали в процентах, для НСТ-теста дополни-

тельно вычисляли индекс активации по формуле $IA = \frac{HCT_{стим}}{HCT_{спонт}}$, для ЦТТ рассчитывали индекс цитотоксичности по формуле $ИЦ = \frac{(O-K)}{K}$, где O – процент погибших клеток в опытной пробе, содержащей клетки-мишени и клетки-эффекторы; K – процент погибших клеток в контрольной пробе, содержащей клетки-мишени и среду. Результаты ИФА выражали в пг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических (Стьюдента) и непараметрических (Уилкоксона – Манна – Уитни) методов.

Результаты и обсуждение. При световой и люминесцентной микроскопии мазков в клетках и вне клеток определяется наличие конгломератов НЧ. Светооптическая оценка клеток, способных к фагоцитозу (моноцитов и нейтрофилов), показала, что НЧ металлов как проникают внутрь клеток, так и прилипают к их мембране. В лимфоцитах также были обнаружены конгломераты частиц, особенно заметные при использовании НЧ железа. Инкубация с НЧ не приводила к визуально регистрируемому развитию повреждений клеток.

Результаты, иллюстрирующие действие НЧ биогенных металлов на показатели фагоцитарного звена иммунной системы, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние инкубации с наночастицами биогенных металлов на функциональную активность нейтрофилов и экспрессию мембранных рецепторов моноцитов (%)

Клетки	Показатели	Пробы (n=17)		
		контроль	НЧ Fe	НЧ Zn
Нейтрофилы	HCTспонт	15,1±2,1	15,7±1,1	14,9±1,6
	HCTстим	29,1±1,7	34,4±2,6**	28,0±1,9**
	ИА	2,0±0,03	2,2±0,05**	1,88±0,1**
Моноциты	CD14	14,4±0,62	15,8±0,8	14,8±1,2
	HLA-DR	13,13±0,5	15,8±0,5**	13,0±1,0**

Примечание: * – статистически достоверные отличия от контроля (p<0,05); ** – статистически достоверные различия в зависимости от вида НЧ.

Как видно из таблицы 1, действие НЧ Zn и НЧ Fe на интенсивность реакций «дыхательного взрыва» в нейтрофилах было статистически недостоверно по сравнению с контролем, однако имелись различия между металлами. Так, выявлены более высокие показатели стимулированного HCT-теста, а также индекса активации при инкубации с НЧ Fe по сравнению с НЧ Zn. Отмечена также некоторая стимуляция экспрессии моноцитарных рецепторов HLA-DR при действии НЧ Fe. Данный показатель превышает не только контроль, но и результат пробы, инкубированной с НЧ Zn. Влияния инкубации с НЧ на экспрессию рецептора CD14 не выявлено.

Результаты, позволяющие оценить действие исследуемых НЧ на функциональную активность НК-клеточного звена иммунной системы, представлены в таблице 2. Постановка цитотоксического теста с обработанными НЧ Fe и НЧ Zn лимфоцитами больных в качестве клеток-эффекторов и культурой K562 в качестве клеток-мишеней выявила статистически значимое усиление цитотоксичности лимфоцитов после их преинкубации с НЧ Fe в концентрации 1 мкг/мл. При световой микроскопии не было обнаружено разрушенных лимфоцитов в пробах после инкубации с НЧ и клетками-мишенями.

Таблица 2

Влияние инкубации с наночастицами биогенных металлов различных концентраций на цитотоксическую активность лимфоцитов больных

Пробы	Клетки-эффекторы	Результаты ЦТТ (n=11)	
		% погибших клеток-мишеней (K562)	ИЦ
Контроль	Лимфоциты	30,3±3,36	0,85±0,1
Опыт	Лимфоциты+НЧ Fe 0,01 мкг/мл	33,1±1,09	1,06±0,15
	Лимфоциты+НЧ Fe 1 мкг/мл	39,0±1,7*	1,44±0,2*
	Лимфоциты+НЧ Zn 0,01 мкг/мл	34,3±5,08	1,2±0,4
	Лимфоциты+НЧ Zn 1 мкг/мл	33,0±7,56	1,2±0,5

Примечание: * – статистически достоверные отличия от контроля (p<0,05).

Результаты определения уровней цитокинов в супернатантах 24-часовых культур МНК показали, что в целом при инкубации с НЧ металлов статистически достоверных различий продукции цитокинов не выявляется. Например, уровень TNF-α в контроле составил 94,16±11,2, а при инкубации с НЧ Zn 103,3±9,9 пг/мл; данные по уровню IL-10 составляли 8,17±2,62 и 20,05±6,54 пг/мл соответственно. По остальным исследованным цитокинам наблюдалась аналогичная картина: вариабельность данных внутри каждой группы значительна, различия статистически недостоверны. Тем не менее при раздельном анализе проб с исходно низкой (группа I) и высокой (группа II) спонтанной продукцией цитокинов отмечены некоторые статистически значимые различия в зависимости от инкубации с НЧ (табл. 3). Так, в 7 пробах из 12 наблюдался исходный незначительный спонтанный уровень TNF-α; в этой группе (I) инкубация с НЧ Zn и НЧ Fe вызывала повышение его продукции в 3,3 и 3,5 раза соответственно. В остальных 5 пробах, где был отмечен исходно высокий уровень спонтанной продукции этого цитокина (II), инкубация с НЧ вызвала статистически значимое его снижение для НЧ Fe. При инкубации этих проб с НЧ Zn отмечено уменьшение продукции TNF-α в 4 пробах из 6 на 20–97%. При инкубации МНК с НЧ Zn наблюдалась статистически значимая стимуляция продукции IL-1α в пробах с низкой базальной продукцией (I) этого цитокина (в 4,8 раза) и отсутствие влияния при высокой продукции (II). Уровни IL-10 при инкубации МНК с НЧ Zn возрастали в 9 пробах из 12, хотя и незначительно, и снижались в 3 пробах. Влияние инкубации с НЧ Zn и НЧ Fe на продукцию остальных исследованных цитокинов было разнонаправленным в различных пробах и не укладывалось в определенную тенденцию.

Таблица 3

Влияние инкубации мононуклеаров с наночастицами биогенных металлов на продукцию цитокинов в зависимости от ее базального уровня

Пробы (n=12)		Уровень спонтанной продукции (пг/мл)			
		TNF-α		IL-1α	
		I	II	I	II
Контроль	Min	6,3	92	2,5	154
	Max	35,4	327	80	487
	M±m	14,2±4,3	187,5±34,8	39,6±13,7	380±49
НЧ Fe	Min	6,99	12	5,3	17
	Max	142,4	111	480	462
	M±m	50,4±19,8	41,5±17,7*	177±104	177±105
НЧ Zn	Min	2,2	26,8	8,9	15
	Max	167,4	370	461	489
	M±m	46,8±19,0	179±73,7	193±61,4*	317±70

Примечание: * – статистически достоверные отличия от контроля (p<0,05).

Заключение. Таким образом, установлено определенное влияние НЧ биогенных металлов на ряд фенотипических и функциональных характеристик иммунокомпетентных клеток, регистрируемое при инкубации *in vitro*. Среди полученных изменений отмечены: стимуляция экспрессии рецепторов HLA-DR на моноцитах, а также функциональной активности естественных киллеров при действии НЧ Fe; модулирующее влияние на продукцию монокинов TNF- α и IL-1 α при инкубации с НЧ Fe и НЧ Zn. Сопоставление эффектов НЧ исследованных биогенных металлов показало, что при действии НЧ Fe оказались выше экспрессия HLA-DR на моноцитах и активность кислородозависимых реакций в нейтрофилах по сравнению с НЧ Zn. По данным литературы [6], металлические НЧ могут проникать в клетки как путем фагоцитарного захвата, так и трансмембранно. По-видимому, при попадании в нейтрофилы и моноциты имеет место первый вариант, а в лимфоциты – второй. Фиксация НЧ на мембранах клеток также может оказывать влияние на их функцию. Полученные нами результа-

ты свидетельствуют об отсутствии повреждающего действия исследованных металлических наночастиц на клетки, опосредующие фагоцитарное, T- и NK-клеточное звенья иммунной системы, на модели инкубации *in vitro*. Отсутствие резкого стимулирующего или угнетающего влияния НЧ биогенных металлов на показатели иммунокомпетентных клеток при наличии мягких модулирующих эффектов, отчасти зависящих от фоновых показателей, в целом может быть расценено как позитивное действие. Следует отметить, что эффекты НЧ *in vitro* и *in vivo* могут не совпадать. Например, отмеченная стимуляция наночастицами Fe фагоцитирующих клеток (нейтрофилов и макрофагов) может привести к неконтролируемому транспорту этими клетками металлических НЧ в различные органы и системы, в связи с чем актуализируется проблема направленного переноса, возможно, с помощью дополнительных воздействий физическими факторами, например магнитными полями [9].

Работа частично поддержана проектом РФФ № 14-35-00051.

Литература

1. Загора, Г. И. Влияние наночастиц металлов на состояние культуры клеток эритромиелоза человека / Г. И. Загора, Е. Ю. Златник // Известия ВУЗов, Северо-Кавказский регион. Естествозн. Клиническая и экспериментальная онкология. – 2010. – Спецвыпуск. – С. 91–94.
2. Златник, Е. Ю. Экспериментальное изучение влияния наноразмерных частиц металлов на опухолевый рост и костномозговое кроветворение / Е. Ю. Златник, Л. В. Передреева // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 113–117.
3. Кудрин, А. В. Микроэлементы в иммунологии и онкологии / А. В. Кудрин, О. М. Громова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 544 с.
4. Лахтин, В. М. Нанотехнологии и перспективы их использования в медицине и биотехнологии / В. М. Лахтин, С. С. Афанасьев, М. В. Лахтин [и др.] // Вестник Российской АМН. – 2008. – № 4. – С. 50–55.
5. Мешалкин, Ю. П. Перспективы и проблемы использования неорганических наночастиц в онкологии / Ю. П. Мешалкин, Н. П. Бгатова // Journal of Siberian

an Federal University. Biology. – 2008. – Vol. 1, № 3. – P. 204–208.

6. Мильто, И. В. Электронно-микроскопическое исследование печени крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита / И. В. Мильто, И. В. Суходоло, А. А. Миллер // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 4. – С. 510–513.
7. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: Бином, 2011. – 690 с.
8. Borodulin, V. B. Study of biological effects of iron nanoparticles / V. B. Borodulin, I. A. Goroshinskaya, P. S. Kachesova [et al.] // Nanotechnologies in Russia. – 2015. – Vol. 10, № 3-4. – P. 268–277.
9. Jian-ming, W. Effect of targeted magnetic nanoparticles containing 5-FU on expression of bcl-2, bax and caspase 3 in nude mice with transplanted human liver cancer / W. Jian-ming, Zh. Jian-wei, X. Bao-lai // Clin. J. Hepatobiliary Surg. – 2007. – Vol. 13, № 9. – P. 621–623.
10. Shuming, N. Nanotechnology application in cancer / N. Shuming, X. Yun, K. Gloria J., S. Joanthan // Ann. Rev. Biomed. Engineer. – 2007. – Vol. 9. – P. 257–288.

References

1. Zakora G. I., Zlatnik E. Yu. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya onkologiya*. – *Clinical and experimental oncology*. 2010;spetsvypusk:91-94.
2. Zlatnik E. Yu., Peredreyaeva L. V. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. – *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;153(1):113-117.
3. Kudrin A. V., Gromova O. M. *Mikroelementy v immunologii i onkologii*. Moscow: «GEOTAR-Media»; 2007. 544 p.
4. Lakhtin V. M., Afanasyev S. S., Lakhtin M. V., Aleshkin V. A., Nesvizhsky Yu. V., Pospelova V. V. *Vestnik Rossyskoy AMN*. – *Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences*. 2008;4:50-55.
5. Meshalkin Yu. P., Bgatova N. P. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2008;1(3):204-208.

6. Milto I. V., Sukhodolo I. V., Miller A. A. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. – *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;153(4):510-513.
7. Freshni R. Ya. *Kultura zhivotnykh kletok. Prakticheskoye rukovodstvo*. Moscow: «Binom»; 2011. 690 p.
8. Borodulin V. B., Goroshinskaya I. A., Kachesova P. S., Babushkina I. V., Polozhentsev O. E., Durnova N. A., Vasiliadis R. A., Losev O. E., Chesovskikh Yu. S. *Nanotechnologies in Russia*. 2015;10(3-4):268-277.
9. Jian-ming W., Jian-wei Zh., Bao-lai X. *Clin. J. Hepatobiliary Surg*. 2007;13(9):621-623.
10. Shuming N., Yun X., Gloria K. J., Joanthan S. W. *Ann. Rev. Biomed. Engineer*. 2007;9:257-288.

Сведения об авторах:

Златник Елена Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей;
e-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Загора Галина Ивановна, научный сотрудник лаборатории;
e-mail: rniol@list.ru

Непомнящая Евгения Марковна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории;
e-mail: rniol@list.ru