

В. Ю. Гальчінська, канд. біол. наук,
 П. С. Семенових,
 К. А. Шеховцова, канд. біол. наук,
 А. Б. Шитова, канд. біол. наук

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ АТЕРОГЕННИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ НА МІГРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ МОНОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

Інститут терапії АМН України, Харків

Процеси, що призводять до функціональної і структурної дезорганізації моноцитів та перетворення їх у пінисті клітини, тісно пов'язані з утворенням модифікованих ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ). Однією з ланок патогенезу атеросклерозу є автоімунна модифікація ліпопротеїдів з подальшим утворенням імунних комплексів ЛПНЩ — антитіло, що мають яскраво виражені атерогенні властивості. У низці клінічних та експериментальних досліджень було виявлено зв'язок між присутністю в крові імунних комплексів ЛПНЩ — антитіло і розвитком атеросклерозу [1–3].

Існує припущення, що підвищення афінності рецепторів моноцитів до атерогенних імунних комплексів може бути однією з причин порушення моноцитарного кліренсу ліпідів при атеросклерозі. Друга причина може полягати в тому, що при взаємодії імунних комплексів зі специфічними рецепторами на моноцитах відбувається порушення функціонування систем вторинних месенджерів (циклічні нуклеотиди, похідні арахідонової кислоти, фосфоінозитидний обмін, іони Ca^{++}), що позначається як на метаболізмі клітин, так і на їх локомоторних функціях [4–6].

Мета нашої роботи полягала у вивченні особливостей специфічної міграції моноцитів крові людини у відповідь на атерогенні імунні комплек-

си в умовах *in vitro*. Дослідження виконані на первинній культурі моноцитів крові людини з використанням експериментальної моделі пінистої клітини [6].

Матеріали та методи дослідження

В експериментах використовувалася стабілізована 0,1%-м розчином ЕДТА кров 15 здорових донорів (чоловіки віком від 25 до 45 років). Моноцити з цільної крові виділяли шляхом градієнтного центрифугування за методом [7]. В експериментах використовували суспензію мононуклеарних клітин, що містила не менше 90 % живих моноцитів. Контроль життєздатності клітин здійснювався вітальним забарвленням моноцитів трипановим синім.

Імунні комплекси виділяли за методом [8] у хворих з коронарним атеросклерозом, тестували на вміст ліпопротеїдів та холестерину (ХС) і використовували у відповідних розведеннях від 5 до 100 мкг ХС/мл.

Моноцити культивували в поліетиленових пластикових планшетах з діаметром лунок $d=20$ мм, при концентрації моноцитів 1×10^6 клітин на лунку при температурі $37^\circ C$ в інкубаційній суміші, що складалася із середовища 199 з додаванням 20 ммоль/л НЕРЕС, сироваткового альбуміну бика (1 мг/мл), 10%-ї ембріональної сироватки теляти й антибіо-

тиків (200 мкг/мл стрептомицину і 100 Од/мл пеніциліну).

Для вивчення динаміки зміни рівня циклічного АМФ у моноцитах під впливом імунних комплексів клітини інкубували при $37^\circ C$ з відповідним агентом у вищеописаному інкубаційному середовищі без ембріональної сироватки теляти. Для пригнічення активності фосфодієстерази використовували ізобутилметилксантин (10^{-5} моль/л). Реакцію зупиняли додаванням в інкубаційне середовище 10%-ї трихлороцтової кислоти через різні проміжки часу (15, 30 с, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 і 120 хв). Циклічний АМФ екстрагували за методом [9] і визначали кількість, використовуючи набори для радіоізотопного тестування фірми “Amersham” (Велика Британія).

Для вивчення обміну фосфоінозитидів моноцити витримували протягом 42 год з 3H -міоінозитолом, потім інкубували з імунними комплексами і після припинення реакції наносили на колонки з Dowex ($Ag\ 1 \times 8$, 200–400 меш, “Sigma Chemical Co.”, Лондон). Фосфоінозитиди елювали розчином формату амонію різної іонної сили.

Міграційні властивості моноцитів досліджували в камері Бойдена з використанням полікарбонатних мембранних фільтрів з діаметром пор 8 мкм (Poretics Co.) [10]. Для оцінки міграції використовували стандартний хемоатрактант син-

тетичний N-форміловий олігопептид, форміл-метіоніл-лейцил-фенілаланін (ФМЛФ) у концентрації 10^{-7} – 10^{-9} моль/л. Підрахунок моноцитів, що мігрували, проводився під мікроскопом і виражався кількістю клітин, видимих у 20 випадкових полях при 400-разовому збільшенні.

Дані, отримані нами, підлягали статистичній обробці з використанням варіаційної статистики за стандартними ліцензійними комп'ютерними програмами. Відмінності між групами середніх величин та їх похибки ($M \pm m$) оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважалася ймовірна похибка менша 5 % ($P < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з літературними даними, практично всі моноцити несуть на своїй поверхневій мембрані рецептори для ФМЛФ. Це послужило підставою для використання ФМЛФ як стандартного агента для вивчення хемотаксису моноцитів *in vitro* в оптимальній концентрації 10^{-8} моль/л. ФМЛФ, що знаходився в нижньому відділі камери Бойдена, досить швидко створював градієнт концентрації і спричинював активну

міграцію моноцитів, розміщених у верхньому відділі камери, через мембранний фільтр (рис. 1, А). Як показали проведені дослідження, імунні комплекси також є активними хемотаксинами щодо моноцитів і спричинюють дозозалежну міграцію моноцитів крові людини концентрацією від 5 до 100 мкг ХС/мл. Слід зазначити, що у більшості експериментів хемоатрактантна активність імунних комплексів була вищою, ніж хемоатрактантна активність стандартного агента ФМЛФ (рис. 1, Б), що є дуже істотним показником, тому що серед моноцитів крові людини тільки 35–40 % клітин здатні мігрувати у відповідь на загальноприйняті хемотаксичні стимули. Як показали виконані нами раніше дослідження [6], інкубація моноцитів з імунними комплексами протягом 16–24 год призводить до утворення пінистих клітин. З урахуванням цих даних було виконано серію експериментів з 16-годинною преінкубацією моноцитів та імунних комплексів у верхній частині камери Бойдена і подальшим введенням у нижній відділ камери ФМЛФ (10^{-8} моль/л). При цьому спостерігалось різке зниження міграції моноцитів уздовж градієнта концентрації

ФМЛФ (рис. 1, В), кількість клітин, що мігрували, не відрізнялася від контролю (інкубація моноцитів у камері Бойдена під час відсутності хемоатрактанту). Таким чином, імунні комплекси спричиняють виражене гальмування хемотаксису моноцитів стосовно ФМЛФ, різко знижуючи локомоторну функцію клітин.

Незважаючи на його актуальність, досі недостатньо вивченим залишається питання про вплив різних медикаментозних препаратів на локомоторні властивості моноцитів. У цьому аспекті особливий інтерес викликає дослідження можливого впливу на хемотаксис моноцитів таких розповсюджених у кардіологічній практиці лікарських препаратів, як антагоністи повільних кальцієвих каналів. Як показали попередні дослідження [6], антагоністи кальцію перешкождали трансформації моноцитів у пінисті клітини. У наших експериментах попередня 2-годинна інкубація моноцитів з ніфедипіном (10^{-6} моль/л) призводила до пригнічення локомоторних функцій клітин й істотно знижувала їхню міграційну активність у відповідь на імунні комплекси (рис. 1, Г). Очевидно, антагоністи кальцію не тільки активують механізми видалення надлишку внутрішньоклітинного холестерину, але й знижують міграційні властивості моноцитів, що також може мати певне значення в реалізації антиатерогенних ефектів цих сполук.

З огляду на те, що адгезія та міграція моноцитів/макрофагів — процеси, які порівняно легко піддаються реєстрації й оцінці *in vitro*, досить адекватно відбивають функціональний статус клітин і є критерієм їх активації, можна зробити висновок, що імунні комплекси й в умовах *in vivo* стимулюють адгезію та міграцію мононуклеарних клітин в інтиму артерій. З іншого боку,

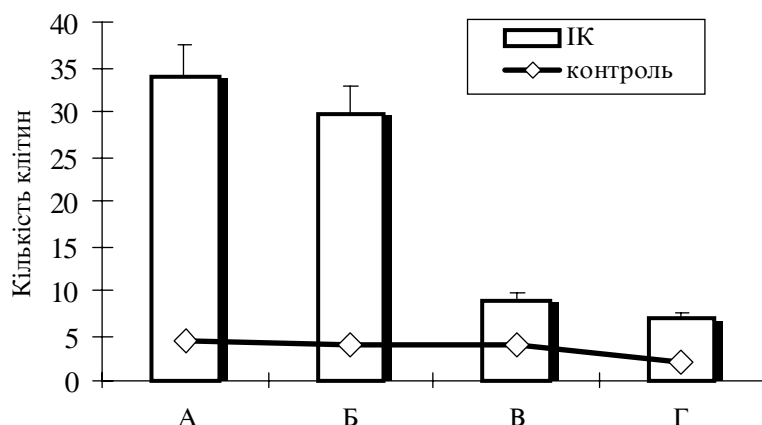


Рис. 1. Хемотаксис моноцитів у відповідь на імунні комплекси та ФМЛФ: А — хемотаксис моноцитів у відповідь на імунні комплекси; Б — хемотаксис моноцитів у відповідь на ФМЛФ; В — хемотаксис моноцитів після інкубації з імунними комплексами протягом 16 год у відповідь на ФМЛФ; Г — хемотаксис моноцитів після інкубації з ніфедипіном протягом 2 год у відповідь на імунні комплекси

підвищена «липкість» клітинних мембран, що призводить до посиленої адгезії моноцитів, може проявлятися в умовах *in vivo* гальмуванням їхньої міграції та зниженням виходу клітин із судинної стінки. Не виключено, що цей феномен має місце у разі трансформації моноцитів у пінисті клітини і їх затримки в стінках судин.

Таким чином, імунні комплекси мають виражені хемоатрактантні властивості, але безпосередня їх взаємодія з моноцитами може призводити до зниження локомоторних функцій клітин. Останнє є істотним моментом у розшифровці механізму трансформації моноцитів у пінисті клітини.

Аналіз даних, отриманих нами при визначенні впливу імунних комплексів на активність аденілатциклазної системи і рівень обміну фосфоінозитидів, виявив чіткий взаємозв'язок між функціонуванням систем вторинних посередників і проявом локомоторних клітинних властивостей у відповідь на хемотаксичні стимули. Так, ініціація хемотаксису моноцитів у відповідь на імунні комплекси супроводжувалася короткочасним підвищенням концентрації циклічного АМФ й активацією обміну фосфоінозитидів. На 1-й хвилині після початку інкубації з імунними комплексами рівень циклічного нуклеотиду зростав більш ніж у 2 рази порівняно з вихідними значеннями, з $(135,14 \pm 23,2)$ пкмоль/ 10^6 клітин до $(284,9 \pm 29,9)$ пкмоль/ 10^6 клітин, ($P < 0,01$), та знижувався до контрольних значень через 10 хв. Розщеплення фосфатиділінозитол-4,5-бісфосфату (PIP_2) з подальшою продукцією інозитол-1,4,5-трисфосфату (IP_3), який мобілізує кальцій, і активатора протеїнкінази С 1,2-діацилгліцерину (ДАГ) відбувалося протягом 1 хв. Пік утворення IP_3 наставав на 5–15 с, потім його вміст різко знижувався (рис. 2). Підвищення концентрації 1,4- IP_2 було більш

стабільним, а його подальше зниження менш вираженим. Кінетика зміни концентрації 4- IP_1 відображає послідовність метаболізму IP_3 до інозитоли. Так, рівень фосфоінозитиду поступово підвищувався, починаючи з 5-ї секунди, і досягав максимальних значень на 10-й хвилині (див. рис. 2).

Порівняльний аналіз результатів вивчення кінетики розщеплення PIP_2 і змін вмісту циклічного АМФ дозволяє висловити припущення про можливість альтернативності цих процесів, принаймні, протягом 1-ї хвилини трансформації стимулюючого сигналу. Очевидно, і в тому, і в іншому випадку взаємодія імунних комплексів з відповідними рецепторами на поверхні плазматичної мембрани моноцита приводить до практично одночасної активації кількох білків, що зв'язують ГТФ, і запуску подальших реакцій, які врешті-решт і забезпечують перебудову цитоскелетних білків і реалізацію хемотаксису.

Висновки

Таким чином, результати дослідження хемотаксичних реакцій моноцитів засвідчили, що імунні комплекси є до-

сить сильними хемоатрактантами стосовно цих клітин. Раннім і принципово важливим етапом для ініціації хемотаксису моноцитів у відповідь на імунні комплекси є активація утворення циклічного АМФ і розщеплення PIP_2 з подальшим утворенням біологічно активних метаболітів, зокрема 1,4,5- IP_3 , що мобілізує кальцій. Антагоністи кальцію (ніфедипін) істотно знижують міграцію моноцитів у відповідь на імунні комплекси.

Попередня інкубація моноцитів з імунними комплексами (протягом 16 год) призводить до різкого зниження локомоторної активності клітин і гальмує їх міграцію у відповідь на такий активний хемоатрактант як ФМЛФ, тобто, з одного боку, імунні комплекси є сильними хемоатрактантами і можуть спричинювати адгезію та міграцію моноцитів в інтиму артерій, а з іншого — безпосередня взаємодія цих агентів з мононуклеарними клітинами пригнічує локомоторні функції останніх і може гальмувати вихід ліпіднавантажених макрофагів із судинної стінки. Ця особливість імунних комплексів може відігравати істотну роль у пускових механізмах атерогенезу.

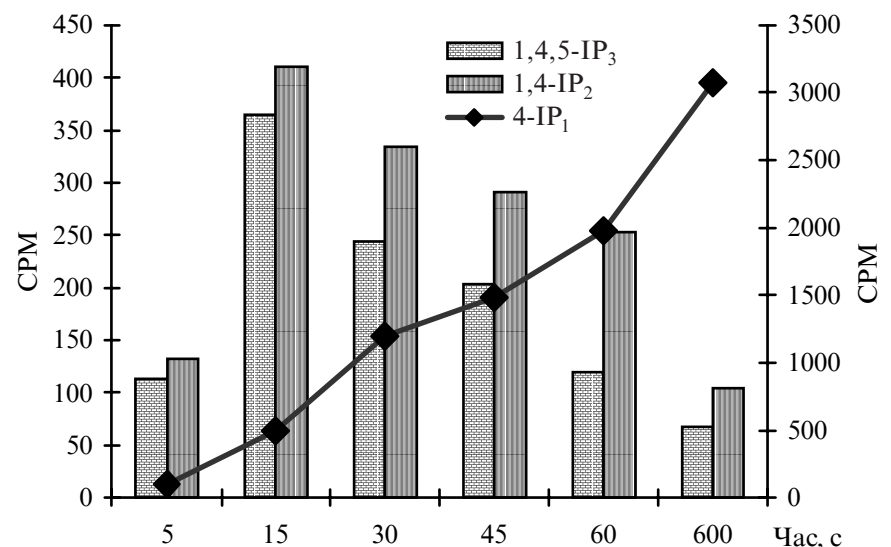


Рис. 2. Кінетика утворення фосфоінозитидів у моноцитах під впливом імунних комплексів. За віссю ординат — радіоактивність стимульованих клітин у СРМ мінус радіоактивність клітин у контролі (тільки інкубаційне середовище)

ЛІТЕРАТУРА

1. *Nasonov E. L.* Immunologic markers of atherosclerosis // *Ter. Arkh.* — 2002. — Vol. 74. — P. 80-85.
2. *Proatherogenic* and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL / *G. Virella, D. Atchley, S. Koskinen et al.* // *Clin. Immunol.* — 2002. — Vol. 105. — P. 81.
3. *Detection* of IgG-bound lipoprotein(a) immune complexes in patients with coronary heart disease / *J. Wang, H. Qiang, C. Zhang et al.* // *Clin. Chim. Acta.* — 2003. — Jan. — P. 115-122.
4. *Novel mechanism* of PTEN regulation by its PIP2 binding motif is critical for chemotaxis / *M. Ijima, Y. E. Huang, H. R. Luo et al.* // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Feb. — P. 5.
5. *LDL immune complexes* stimulate LDL receptor expression in U937 histiocytes via extracellular signal-regulated kinase and AP-1 / *Y. Fu, Y. Huang, S. Bandyopadhyay et al.* // *J. Lipid Res.* — 2003. — Jul. — Vol. 44. — P. 1315-1321.
6. *Трансформація моноцитів* в пінисті клітини та антиатерогенні ефекти антагоністів кальцію / *В. Ю. Гальчінська, І. К. Кондаков, Н. Г. Мензянова, А. Н. Губарев* // *Журн. АМН України.* — 2000. — Т. 6, № 1. — С. 137-144.
7. *Recalde H. R.* A simple method of obtaining monocytes in suspension // *J. Immunol. Meth.* — 1984. — Vol. 69, N 1. — P. 71-72.
8. *Стручков И. В., Константинова И. А., Лаврєнева А. А.* Скрининг-тест для оценки патогенных свойств иммунных комплексов // *Лаб. дело.* — 1985. — № 7. — С. 411-412.
9. *Menzianova N., Galchynskaya V. Yu., Bogkov A. I.* Content of c-AMP and metabolites of arachidonic acid during transformation of monocytes into foam cells // *Биол. вестник.* — 1997. — № 1. — С. 65-72.
10. *Adams D. O., Hamilton T. A.* The cell biology of macrophage activation // *Ann. Rev. Immunol.* — 1984. — Vol. 2. — P. 283-318.

УДК 616.155.33:576.8.077.3

В. Ю. Гальчінська, П. С. Семенових, К. А. Шеховцова, А. Б. Шитова

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ АТЕРОГЕННИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ НА МІГРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ МОНОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

Досліджено особливості специфічної міграції моноцитів крові людини у відповідь на атерогенні імунні комплекси в умовах *in vitro*. Дослідження виконане на первинній культурі моноцитів крові здорових донорів з використанням камери Бойдена. Показано, що імунні комплекси є сильними хемоатрактантами стосовно моноцитів, але безпосередня взаємодія цих агентів з мононуклеарними клітинами пригнічує локомоторні функції останніх. Раннім і принципово важливим етапом для ініціації хемотаксису моноцитів у відповідь на імунні комплекси є активація утворення циклічного АМФ і розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфату з подальшим утворенням біологічно активних метаболітів. Антагоністи кальцію (ніфедипін) істотно знижують міграцію моноцитів у відповідь на імунні комплекси.

Ключові слова: моноцити, імунні комплекси, хемотаксис, циклічний АМФ, фосфоінозитиди, антагоністи кальцію.

UDC 616.155.33:576.8.077.3

V. Yu. Galchynska, P. S. Semenyukh, K. A. Shekhovtsova, A. B. Shitova

SPECIFIC EFFECTS OF ATHEROGENIC IMMUNE COMPLEXES ON MIGRATORY PROPERTIES OF HUMAN BLOOD MONOCYTES

Peculiarities of specific migration of human blood monocytes in response to atherogenic immune complexes *in vitro* conditions have been investigated. The study has been carried out on primary culture of blood monocytes from healthy donors with the use of Boyden camera. It has been shown that immune complexes were strong chemoattractants relative to monocytes, but direct interaction of these agents with mononuclear cells decreased the locomotor functions of the latter. The early and principally important stage for the initiation of monocytes chemotaxis in response to immune complexes is activation of formation of cyclic AMP and cleavage of phosphatidylinositol-4.5-bisphosphate with the subsequent production of biologically active metabolites. Calcium antagonists (nifedipine) markedly decrease monocytic migration in response on immune complexes.

Key words: monocytes, immune complexes, chemotaxis, cyclic AMP, phosphoinositides, calcium antagonists.

УДК 616.831-009.11-053.2-08:615.825

С. І. Лазарева

ДИНАМІКА РУХОВОЇ АКТИВНОСТІ У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА СПАСТИЧНІ ФОРМИ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛІЧУ, В УМОВАХ САНАТОРНО-КУРОРТНОГО ЛІКУВАННЯ

Одеський державний медичний університет

Основним клінічним проявом дитячого церебрального паралічу є порушення функції руху. Складність цих проявів залежить від тяжкості уражен-

ня головного мозку в пре-, інтра- і постнатальному періодах розвитку. Однак літературні дані та досвід роботи показують, що відновлення

рухової функції досягається, насамперед, при здійсненні систематичного тренування нервово-м'язового апарату. Застосування лікувальної гімна-