

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК [57+61]:539.1.04:576.311.332:599.323.4

**ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА “ПОВИАРГОЛ”
НА ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ
МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ**

© 2012 г. С. К. Пирутин^{1,2,*}, В. Б. Туровецкий¹, Ю. М. Ефремов¹, К. В. Шайтан¹,
Ю. Б. Кудряшов¹, А. Б. Рубин¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
кафедра биофизики, Москва

²Институт экспериментальной и теоретической биофизики РАН, Пушкино

В работе изучено повреждающее действие препарата “Повиаргол”, содержащего наночастицы серебра, на мембраны перитонеальных мышечных макрофагов. Проведенные исследования показали, что повреждающее действие Повиаргола наблюдается, начиная уже с его концентрации 2 мкг/мл, достигая максимальных значений при концентрации 10–12 мкг/мл. Снижение температуры инкубации от 30 до 4°C приводит к усилению мембранотропного эффекта препарата. Однако в интервале от 37 до 30°C наблюдается обратная зависимость. Повреждающее действие Повиаргола усиливается при повышении рН среды инкубации до 8.4, а также при возрастании концентрации ионов кальция в среде до 8 ммоль/л. Эффект повреждения снижается при уменьшении рН среды до 6.3, а также при действии радиопротектора серотонина. Проведенные исследования позволяют предположить, что значительная роль в повреждающем действии наночастиц Повиаргола на мембраны макрофагов принадлежит активным формам кислорода и процессам перекисного окисления липидов.

Наночастицы серебра, повреждение мембран, перитонеальные макрофаги, рН, Ca²⁺, серотонин, перекисное окисление липидов.

В последние годы благодаря своим особым свойствам различные виды наночастиц находят все более широкое применение в различных областях народного хозяйства, а также в медицине. В то же время вследствие своей высокой биологической активности наночастицы могут в определенных условиях обладать значительным токсическим эффектом и представлять опасность для здоровья человека [1–3]. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется изучению цитотоксических свойств наночастиц. Одним из видов наночастиц, используемых в медицине, являются наночастицы серебра. Нанопрепараты коллоидного серебра из наночастиц, взвешенных в водном растворе, содержащем стабилизатор коллоидной системы, находят применение в медицине благодаря своему широкому спектру противомикробного действия, отсутствию устойчивости к ним у большинства патогенных микроорганизмов и низкой токсичности в отношении эукариотических клеток [4, 5]. На основе этих наночастиц создано весьма эффективное противомикробное средство “Повиаргол”.

В связи с вышеизложенным, мы изучили основные закономерности повреждающего дей-

ствия Повиаргола на клеточные мембраны перитонеальных макрофагов мышечных и модифицирующее влияние на этот эффект ряда биологически активных агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служили перитонеальные макрофаги мышечных. Для их получения животных забивали с помощью цервикальной дислокации. Затем вводили в брюшную полость 2 мл раствора Хенкса, содержавшего 10 ммоль/л НЕРЕС (рН 7.2) (“Serva”, Германия), и через несколько минут извлекали перитонеальную жидкость, обогащенную макрофагами. Концентрацию полученной таким образом суспензии клеток доводили тем же раствором до 1.5×10^6 кл./мл. 30 мкл полученной суспензии клеток наносили на покровные стекла для прикрепления к ним макрофагов и инкубировали во влажной камере 45 мин при температуре 22°C. После инкубации покровные стекла промывали раствором Хенкса для удаления неприкрепившихся клеток, помещали их в малые чашки Петри и заливали 2 мл раствора Хенкса. В таких условиях клетки хранили после выделения до и во время проведения эксперимента.

* Адресат для корреспонденции: 119899 Москва, Воробьевы Горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики; тел.: (495) 939-51-50; e-mail: pirutin@yandex.ru.

Для анализа содержания в препаратах клеток с поврежденной мембраной использовали люминесцентный микроскоп “ЛЮМАМ ИЗ” (“ЛОМО”, Ленинград). Возбуждение флуоресценции препаратов осуществляли с использованием галогенной лампы накаливания “КГМ 9-70” и комбинации стеклянных светофильтров “ФС 1-4” и “СЗС 21-2”. Определение целостности плазматической мембраны макрофагов осуществляли с помощью перекрестной окраски двумя флуоресцентными зондами бромистым этидием и флуоресцеиндиацетатом в конечной концентрации 5 мкг/мл (“Serva”, Германия) [6, 7]. Клетки инкубировали с флуорохромами в течение 10 мин, затем отмывали от несвязавшегося красителя и проводили подсчет числа поврежденных клеток. Смену стандартной среды инкубации клеток (рН 7.2) на модифицированную (с измененным рН) производили за 5 мин до введения наночастиц серебра. Увеличение концентрации внеклеточного Ca^{2+} проводили путем прибавления в среду инкубации клеток раствора CaCl_2 (“Serva”) до конечной концентрации 8 ммоль/л за 2 мин до введения наночастиц серебра. Серотонин вводили в среду инкубации клеток до конечной концентрации 0.2% (рН 7.2) также за 2 мин до введения наночастиц. Для инкубации клеток при 30 и 37°C использовали суховоздушный термостат “ТС-1/20 СПУ” (Россия, Смоленск). Инкубацию при 4°C проводили в общей камере холодильника. Стандартной считалась комнатная температура среды инкубации (22°C). В работе использовали отечественный препарат “Повиаргол” (СКТБ “Технолог”, Санкт-Петербург).

Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия между средними арифметическими значениями параметров считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные, полученные при изучении концентрационной зависимости повреждающего действия препарата “Повиаргол” на мембраны перитонеальных макрофагов мышей. Как видно, зависимость имела выраженный S-образный характер, а достоверный эффект повреждающего действия препарата наблюдался уже при его концентрации 2 мкг/мл. Эффект нарастал при увеличении концентрации до 10 мкг/мл и достигал при этом величины около 95%. Дальнейшее увеличение концентрации препарата уже не приводило к усилению повреждения. Как известно, S-образная форма кривой, отражающей зависимость степени повреждения

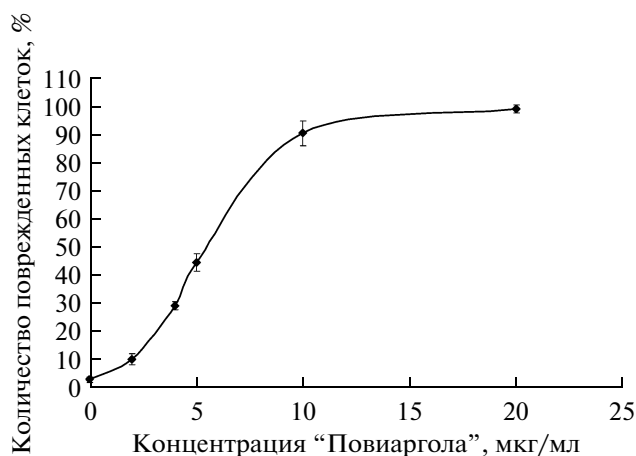


Рис. 1. Концентрационная зависимость повреждающего действия препарата “Повиаргол” на плазматическую мембрану перитонеальных макрофагов мышей.

По оси абсцисс — концентрация Повиаргола в среде инкубации макрофагов, мкг/мл; по оси ординат — относительное содержание в популяции макрофагов клеток с поврежденной плазматической мембраной, %. Инкубацию клеток с препаратом осуществляли в течение 60 мин при 37°C.

клеток от концентрации или дозы какого-либо воздействия, связана с гетерогенностью клеточной популяции по устойчивости к этому воздействию [8]. Также известно, что макрофаги являются достаточно гетерогенными по своим свойствам клетками [9]. Вопрос же о механизмах повреждающего действия наночастиц серебра на клеточную мембрану эукариотических клеток до конца неясен, однако, судя по отдельным литературным данным [10], определенную роль в этом может играть усиление продукции активных форм кислорода (АФК) и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Дальнейшие исследования (рис. 2) выявили выраженную зависимость повреждающего действия препарата на клетки от температуры инкубации. Как видно, снижение температуры от 37 до 30°C приводит к достоверному уменьшению повреждающего эффекта. Однако дальнейшее уменьшение температуры инкубации до 22°C, а затем до 4°C сопровождалось постепенным существенным возрастанием повреждающего действия Повиаргола, достигавшим при 4°C величины 90%. Наблюдаемое нами усиление повреждающего действия Повиаргола при понижении температуры инкубации может быть связано либо со снижением в этих условиях активности структурно-ферментной системы защиты мембран макрофагов от повреждения, либо с изменением физико-химических свойств коллоидного серебра. В пользу первого предположения говорит то, что уменьшение температуры инкубации до 4°C

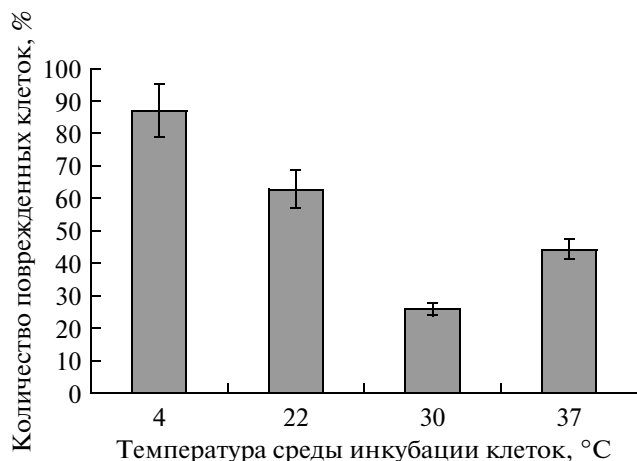


Рис. 2. Зависимость повреждающего действия препарата “Повиаргол” на плазматические мембраны перитонеальных макрофагов мышей от температуры среды инкубации.

По оси абсцисс – температура среды инкубации клеток, °С; по оси ординат – относительное содержание в популяции макрофагов клеток с поврежденной плазматической мембраной, %. Инкубацию клеток с препаратом в концентрации 5 мкг/мл осуществляли в течение 60 мин.

снижает активность всех ферментных процессов в клетке, а увеличение температуры до 37°С повышает ее [11]. Относительно же повышения устойчивости клеток к действию Повиаргола при 30°С можно предположить наличие в этих условиях структурно-конформационного перехода в мембранах, повышающего их устойчивость к повреждению. В этой связи следует отметить, что именно в интервале температур 30–32°С ранее наблюдалось снижение ПОЛ [12]. Совместно с нашими данными это может указывать на то, что повреждающее действие Повиаргола на клеточные мембраны связано с генерацией АФК и, как следствие, с усилением процессов ПОЛ. Уместно также отметить, что в интервале вышеуказанных температур наблюдается повышение активности таких природных липидных антиоксидантов, как α -токоферол и инол [13]. Кроме того следует отметить, что ранее (наши неопубликованные данные) при 30°С наблюдалось уменьшение УФ-индуцированного повреждения мембран макрофагов, в реализации которого, как известно, важная роль принадлежит АФК и процессам ПОЛ [14].

Изучение временной зависимости повреждающего действия Повиаргола при температурах инкубации клеток 22 и 37°С показало (рис. 3), что уже через 20 мин инкубации в популяции макрофагов содержится соответственно около 20 и 25% клеток с поврежденной мембраной. Содержание поврежденных клеток возрастает при увеличении времени инкубации и достигает к 120-й мин почти 100% при обоих температурных режимах. Из рис. 3 так-

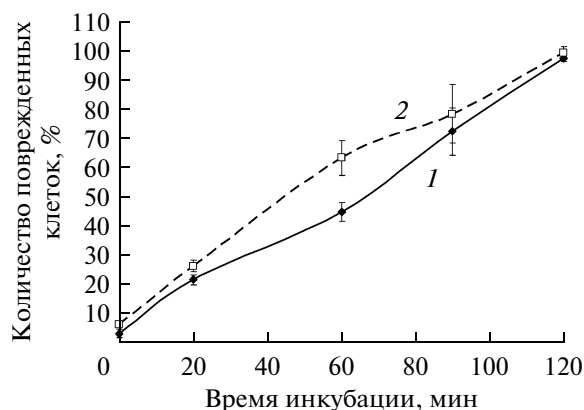


Рис. 3. Временная зависимость повреждающего действия препарата “Повиаргол” на плазматические мембраны перитонеальных макрофагов мышей.

По оси абсцисс – время инкубации макрофагов с Повиарголом, мин; по оси ординат – относительное содержание в популяции макрофагов клеток с поврежденной плазматической мембраной, %. Инкубацию клеток с препаратом в концентрации 5 мкг/мл осуществляли при температуре 37°С (1) и 22°С (2).

же видно, что развитие повреждения к 20-й, 90-й и 120-й мин инкубации при 22 и 37°С фактически совпадают, тогда как через 60 мин повреждение при 22°С оказывается достоверно выше, чем при 37°С. Такое различие можно объяснить, предполагая, что при 37°С более эффективны ферментные клеточные системы [11], в том числе и системы защиты от повреждения. Известно, что по мере накопления продуктов повреждения (в частности и продуктов ПОЛ) в клетке защитные системы последней (в том числе и ферментные) в какой-то момент перестают справляться со своими функциями и наблюдается резкое возрастание выраженности повреждения (происходит так называемый “оксидативный стресс”) [15]. По-видимому, такой “срыв” в работе антиоксидантных систем клеток и наблюдается при их инкубации с наночастицами серебра в течение 90 мин и выше и проявляется в отсутствие достоверных различий в повреждении при 22 и 37°С. Отсутствие же достоверного различия в количестве клеток с поврежденной мембраной при 20-минутной инкубации макрофагов при разных температурах может говорить о том, что при относительно невысоком уровне повреждения вклад ферментных систем в защиту от него незначителен.

С целью углубления представлений о мембранотропном действии Повиаргола на плазматические мембраны макрофагов изучалось изменение выраженности данного эффекта под влиянием ряда агентов, модифицирующих устойчивость мембран к повреждению (изменение рН среды инкубации, повышение содержания в ней Ca^{2+} , а также введение радиопротектора серотонина). Как видно из данных, представленных на рис. 4,

выраженность повреждающего действия Повиаргола достоверно понижается при уменьшении pH среды от 7.2 (стандартная среда инкубации) до 6.3 и увеличивается при возрастании pH до величины 8.4. Эти результаты являются подтверждением данных, полученных ранее при изучении действия на клетки других мембранотропных агентов [16–18], и обусловлены, как полагают, изменением структурно-конформационной компоновки белково-липидного комплекса мембран, приводящим при подкислении среды к повышению устойчивости липидов мембран к процессам ПОЛ. Усиление повреждающего действия Повиаргола наблюдается также и при повышении концентрации в среде инкубации ионов кальция до 8 ммоль/л по сравнению с таковой в стандартной среде инкубации (1.25 ммоль/л). Данный эффект, как и в случае с УФ-индуцированным повреждением клеточных мембран, изученным ранее [19], может быть связан со снижением в этих условиях электрической стабильности липидного бислоя мембраны, а также с усилением ее деструкции в результате увеличения активности ферментных процессов повреждения бислоя на фоне усиления процессов ПОЛ. На рис. 4 также видно, что выраженность повреждающего действия Повиаргола на мембраны макрофагов существенно снижается после предварительного введения в среду инкубации серотонина – радиопротектора, механизм действия которого до конца неясен, но, как полагают, связан с ингибированием процессов ПОЛ в мембранах [20–22]. Этот факт также может говорить в пользу того, что в повреждающем действии на мембраны макрофагов наночастиц серебра, содержащихся в препарате Повиаргола, значительная роль принадлежит процессам образования АФК и ПОЛ.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что повреждающее действие Повиаргола наблюдается, начиная уже с его концентрации 2 мкг/мл, и достигает максимальных значений при концентрации 10–12 мкг/мл. Снижение температуры инкубации от 30 до 4°C приводит к усилению мембранотропного повреждающего эффекта препарата. Однако в интервале температур от 37 до 30°C наблюдается обратная зависимость. Увеличение времени инкубации макрофагов с препаратом от 20 до 120 мин сопровождается возрастанием содержания в популяции поврежденных клеток от 20 практически до 100%. Мембранотропное действие Повиаргола усиливается при повышении pH среды инкубации до 8.4, а также при возрастании в среде концентрации ионов кальция до 8 ммоль/л. Эффект повреждения снижается при уменьшении pH среды до 6.3, а также при действии радиопротектора серотонина в конечной концентрации 0.2%. Проведенные исследования позволяют предположить, что значительная роль в повреждающем действии

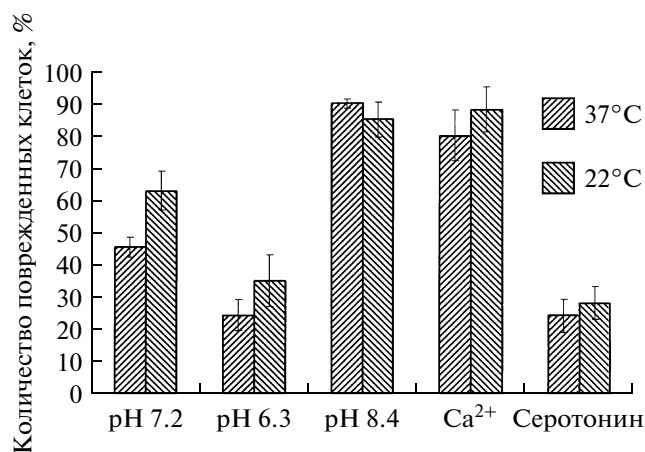


Рис. 4. Модификация повреждающего действия препарата “Повиаргол” на плазматические мембраны перитонеальных макрофагов мышей с помощью ряда агентов.

Данные представлены в виде относительного содержания в популяции макрофагов клеток с поврежденной плазматической мембраной, %. Инкубацию клеток с препаратом в концентрации 5 мкг/мл осуществляли в течение 60 мин при температуре 37 и 22°C в стандартном растворе Хенкса (pH 7.2; 1.25 ммоль/л Ca²⁺) (pH 7.2); в том же растворе, но при pH 6.3 (pH 6.3), или при pH 8.4 (pH 8.4); при концентрации ионов Ca²⁺, равной 8 ммоль/л (Ca²⁺); в присутствии серотонина в конечной концентрации 0.2% (Серотонин).

на мембраны макрофагов препарата Повиаргола, содержащего наночастицы серебра, принадлежит АФК и процессам ПОЛ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глушкова А.В., Радиков А.С., Рембовский В.Р. // “Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды”: Мат. пленум Научн. совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздравсоцразвития Российской Федерации / Под ред. акад. РАМН Ю.А. Рахманина. М., 2007. С. 20–27.
2. Колесниченко А.В., Тимофеев М.А., Протопопова М.В. // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. № 3–4. С. 54–61.
3. Suh W.H., Suslick K.S., Stucky G.D., Suh Y.H. // Progr. Neurobiol. 2009. V. 87. P. 130–170.
4. Щербакова А.Б. // Фарм. журн. 2006. № 5. С. 45–57.
5. Rai M., Yadav A., Gade A. // Biotechnol. Adv. 2009. V. 27. P. 76–83.
6. Dankberg F., Persidsky M.D. // Cryobiology. 1976. V. 13. № 3. P. 430–432.
7. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б. // Радиц. биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 1. С. 113–116.

8. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / Под ред. В.К. Мазурика, М.Ф. Ломанова. М.: Физмалит, 2004. С. 88–90.
9. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. С. 191–203.
10. Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008. V. 179. P. 93–100.
11. Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Иванова Э.В., Рубин А.Б. // Биофизика. 1989. Т. 34. № 6. С. 933–937.
12. Рощупкин Д.И., Мурина М.А. // Биофизика. 1993. Т. 38. Вып. 6. С. 1053–1068.
13. Roshchupkin D.I., Pelenitsyn A.B., Vladimirov Yu.A. // Stud. Biophys. 1978. V. 71. P. 23–27.
14. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. С. 188–192.
15. Кудряшов Ю.Б. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 531–547.
16. Pentilla A., Glaumann H., Trump B.F. // Life Sci. 1976. V. 18. P. 1419–1430.
17. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 2. С. 159–162.
18. Pirutin S.K., Turovetskii V.B., Kudryashov Yu.B. Influence of pH on the UV Sensitivity of Peritoneal Macrophage Plasma Membrane // Biophys. 2010. V. 55. № 1. P. 148–150.
19. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Пирутин О.В., Кудряшов Ю.Б. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 4. С. 438–441.
20. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физмалит, 2004. С. 247.
21. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. С. 288–299.
22. Гончаренко Е.Н., Горская Т.Г., Капля С.А. и др. // Радиобиология. 1980. Т. 20. Вып. 2. С. 266–268.

Поступила в редакцию
26.05.2011

Damaging Effect of “Poviargol” on Mice Peritoneal Macrophage Plasma Membrane

S. K. Pirutin^{1,2*}, V. B. Turovetsky¹, Yu. M. Efremov¹, K. V. Shaitan¹,
Yu. B. Kudryashov¹, A. B. Rubin¹

¹Lomonosov Moscow State University, Biology Faculty, Biophysical Department, Moscow, 119899 Russia
e-mail: pirutin@yandex.ru

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

The damaging effect of “Poviargol”, a substance containing silver nanoparts, was studied. It was shown that the damaging effect of “Poviargol” took place from the concentration of 2 mkg/ml and got its maximum at 10–12 µg/ml. Decrease of the incubation temperature from 30 to 4°C led to amplification of the membrane-acting effect of “Poviargol”; however, inverse relation was observed in the range from 37 to 30°C. The damaging effect of “Poviargol” increased when pH of the incubating medium was raised to 8.4 and also when the concentration of calcium ions in the incubation medium was raised to 8 mmol/l. The damaging effect decreased when pH of the incubation medium was reduced to 6.3, as well as in the presence of radioprotector serotonin. Our study allows us to suppose that reactive oxygen species and lipid peroxidation make a substantial contribution to the damaging effect of “Poviargol” on the macrophage plasma membrane.