



УДК 345.466-74.867:617.713-007

Ульянов В.А.,¹ Величко Л.Н.,² Богданова А.В.,² Макарова М.Б.²

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА *IN VITRO* НА УРОВЕНЬ
ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ
ЛИМФОЦИТОВ И МАРКЕРА АУТОИММУННОГО ПРОЦЕССА
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИРУСНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ
РОГОВИЦЫ**

¹Одесский национальный медицинский университет,²ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН
Украины»e-mail: aleximmun@mail.ru

Изучено влияние *in vitro* наночастиц серебра на экспрессию молекулярных маркеров активации лимфоидных клеток CD 7⁺, CD 25⁺, CD 38⁺, CD 45⁺, CD 54⁺, CD 95⁺, CD 150⁺ и маркера аутоиммунного процесса CD 5⁺, а также на фагоцитарную активность нейтрофилов у больных с вирусной патологией роговицы. В лаборатории иммунологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» была разработана методика культивирования лимфоцитов периферической крови с иммуномодулирующими препаратами, с последующим определением изменения уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов. Оценка уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови проводилась гистоиммуноцитохимическим методом, с использованием панели моноклональных антител CD 5⁺, CD 7⁺, CD 25⁺, CD 38⁺, CD 45⁺, CD 54⁺, CD 95⁺ и CD 150⁺. Исследование было проведено *in vitro* с лимфоцитами периферической крови 23 больных вирусной патологией роговой оболочки глаза. Проведенные нами исследования по изучению воздействия *in vitro* частиц наносеребра на состояние экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови и фагоцитарную активность нейтрофилов у больных с вирусной патологией роговицы, показали достоверное повышение уровня экспрессии CD7⁺, CD 25⁺, CD 45⁺ и фагоцитарной активности нейтрофилов после применения наночастиц серебра.

Ключевые слова: иммунная система, наночастицы серебра, моноклональные антитела, молекулярные маркеры активации.

Ульянов В.А.,¹ Величко Л.М.,² Богданова О.В.,² Макарова М.Б.²

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА *IN VITRO* НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ
МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ І МАРКЕРА
АВТОІМУННОГО ПРОЦЕСУ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА ВИРУСНУ
ПАТОЛОГІЮ РОГІВКИ**

¹Одеський національний медичний університет,²ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН
України»

Досліджено вплив *in vitro* наночастинок срібла на експресію молекулярних маркерів активації лімфоїдних клітин CD 7⁺, CD 25⁺, CD 38⁺, CD 45⁺, CD 54⁺, CD 95⁺, CD 150⁺ і маркера аутоімунного процесу CD 5⁺, а також на фагоцитарну активність нейтрофілів у хворих з вірусною патологією рогівки. У лабораторії імунології ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» була розроблена методика культивування лімфоцитів периферичної крові з імуномодулюючими препаратами, з наступним визначенням зміни рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів. Оцінка рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові проводилася гістоімуноцітохімічним методом, з використанням панелі моноклональних антитіл CD5⁺, CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺ і CD150⁺. Дослідження було проведено *in vitro* з лімфоцитами периферичної крові 23 хворих на вірусну патологію рогової оболонки ока. Проведені нами дослідження з вивчення впливу *in vitro* частинок наносрібла на стан експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові та фагоцитарну активність нейтрофілів у хворих з вірусною патологією рогівки, показали достовірне підвищення рівня експресії CD7⁺, CD 25⁺, CD45⁺ і фагоцитарної активності нейтрофілів після застосування наночастинок срібла.

Ключові слова: імуна система, наночастки срібла, моноклональні антитіла, молекулярні маркери активації.

Ulyanov V.A.,¹ Velichko L.N.,² Bogdanova A.V.,² Makarova M.B.²

SILVER NANOPARTICLES AND EXPRESSION OF MOLECULAR MARKERS IN LYMPHOCYTE ACTIVATION AND MARKER OF AUTOIMMUNE PROCESSES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH VIRAL CORNEAL PATHOLOGY

¹*Odessa National Medical University,*

²*State Institute 'Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy',*

The influence of the nanoparticles of silver on the expression of molecular markers activation of lymphoid cells CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ and CD5⁺ – marker of the autoimmune process, as well as on phagocytic activity of neutrophils in patients with viral pathologies of the cornea was studied *in vitro*. In the Laboratory of Immunology, SI Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine was developed technique of cultivation of peripheral blood lymphocytes with immunomodulation drugs, followed by determination of changes in the level of expression of molecular markers of lymphocyte activation. Assessment of the level of expression of molecular markers of activation of peripheral blood lymphocytes was performed method using a panel of monoclonal antibodies, CD5⁺, CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺ and CD 150⁺. The study was conducted *in vitro* with the peripheral lymphocytes the blood of 23 patients of viral pathology of the cornea. Our studies of the effects of nanosilver particles *in vitro* on the state of expression of molecular markers of activation of peripheral blood lymphocytes and phagocytic activity of neutrophils in patients with viral corneal pathology, showed a significant increase in the level of expression of the CD7⁺, CD25⁺, CD45⁺ and phagocytic activity of neutrophils after application silver nanoparticles.

Key words: immune system, nanoparticles of silver, monoclonal antibodies, molecular markers activation.



В настоящее время вирусные поражения поверхности глазного яблока часто приобретают характер хронического процесса. Использование традиционных медикаментозных средств не всегда приводит к излечению больного и предупреждению рецидивов заболевания (Дрожжина, Гайдамака, 2014). Это определяет актуальность поиска новых подходов к терапии вирусной патологии, причем для разработки оптимальных сочетаний лечебных факторов важно использовать не эмпирические подходы к решению данной задачи, а использовать новые теоретические разработки, полученные в результате изучения молекулярных механизмов иммунного ответа (Bayraktar, 2013).

В настоящее время в литературе большое внимание уделяется изучению механизмов действия и клиническим аспектам применения наночастиц серебра при различной патологии. Величина наночастиц измеряется в нанометрах (миллимикронах), данные частицы обладают особыми свойствами, поскольку при таких масштабах главную роль играют взаимодействие атомов внутри материи и квантово-механические характеристики электронов и фотонов. Иные качества наноматериалов, по сравнению с большими объектами, связаны с возрастанием в них доли поверхности к его массе (Пасечникова, Мальцев, Мороз, 2009а).

Наноразмеры частиц позволяют им проходить через гематоэнцефалический барьер, проникать внутрь клеток и их ядер. Показано, что наночастицы серебра с размерами меньше 100 нм проявляют способность генерировать активные формы кислорода. Наночастицы, проникая сквозь клеточную мембрану, накапливаются в клетке, вызывая изменение ее функций. В организме человека наночастицы серебра могут приводить к целому спектру ответов иммунной системы (Пасечникова, Мальцев, Мороз, 2009b).

Для клинической медицины важным является изучение влияния наночастиц серебра на рецепторный аппарат иммунокомпетентных клеток.

Целью работы было изучение влияния *in vitro* наночастиц серебра на экспрессию молекулярных маркеров активации лимфоидных клеток CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺, CD150⁺ и маркера аутоиммунного процесса CD5⁺, а также на фагоцитарную активность нейтрофилов у больных с вирусной патологией роговицы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В лаборатории иммунологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» была разработана методика культивирования лимфоцитов периферической крови с иммуномодулирующими препаратами, с последующим определением изменения уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов (Дрожжина, Гайдамака, 2014). Оценка уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови

проводилась гистоиммуноцитохимическим методом, с использованием панели моноклональных антител CD5⁺, CD7⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD54⁺, CD95⁺ и CD150⁺. Для иммунофенотипирования использовали панель специфических одноименных моноклональных антител:

CD5⁺ – трансмембранный гликопротеид, молекулярная масса 55 кДа. Экспрессирован на зрелых Т-клетках, большинстве тимоцитов. Функционирует как корецепторная молекула активации, опосредует сигналы, активирующие развитие аутоиммунного процесса;

CD7⁺ – член молекулярного семейства IgSF с молекулярной массой 40 кДа. Экспрессирован на тимоцитах, зрелых Т-клетках, нормальных киллерах, полипотентных гемопоэтических стволовых клетках, кроветворных и лимфоидных клетках-предшественниках. Функционирует как костимуляторная молекула, индуктор секреции цитокинов, модификатор адгезии клеток, индуктор секреции цитокинов;

CD25⁺ – трансмембранный гликопротеид, Тас-антиген, высоко О- и N-гликозирированная молекула типа I. Молекулярная масса 55 кДа. Экспрессирован на активированных Т- и В-лимфоцитах, моноцитах и макрофагах, рецептор ИЛ-2;

CD38⁺ – одноцепочечная трансмембранная молекула типа II (АДФ-рибозилциклаза). Молекулярная масса 45кДа. Экспрессируется на большинстве гемопоэтических клеток преимущественно на ранних стадиях дифференцировки и при активации. Высокий уровень экспрессии на плазматических клетках. Функционирует как регулятор активации и пролиферации, зависящий от клеточного микроокружения, участвует в адгезии лимфоцитов и эндотелиальных клеток;

CD45⁺ – рецептор протеинтирозинфосфатазы - длинная одноцепочечная трансмембранная молекула типа I, общий лейкоцитарный антиген. Молекулярная масса изоформ – 180, 200, 210, 220 кДа. Высокий уровень экспрессии на всех гемопоэтических клетках, особенно высокая плотность экспрессии на лимфоцитах. Участвует в рецептор-опосредуемой активации лимфоцитов;

CD54⁺ – молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM – 1), член семейства IgSF. Молекулярная масса 90 кДа. Высокий уровень экспрессии на активированных эндотелиальных клетках, клетках некоторых опухолей, умеренный на активированных Т-лимфоцитах, активированных В-лимфоцитах и моноцитах. Экспрессия индуцируется на эпителиальных, эндотелиальных клетках и фибробластах при действии цитокинов;

CD95⁺ – трансмембранная молекула типа I, с молекулярной массой 45 кДа. Относится к суперсемейству рецепторов ФНО. Высокий уровень экспрессии на активированных Т- и В-клетках. Опосредует сигналы, индуцирующие апоптоз;



CD150⁺ – одноцепочечная трансмембранная костимулирующая молекула типа I, с молекулярной массой 65-85 кДа. Экспрессируется на тимоцитах, Т- и В-лимфоцитах, дендритических клетках, эндотелиальных клетках. Выполняет функцию костимулирующей молекулы на В-лимфоцитах и дендритических клетках, усиливает пролиферацию этих клеток и выработку иммуноглобулинов.

Разработанная нами методика совместного культивирования лимфоцитов периферической крови больных увеальной меланомой с наночастицами серебра включает следующие этапы:

1. Получение диагностического материала – 3 мл венозной крови.
2. Центрифугирование с использованием градиента плотности фикокол-верографин ($d=1,076-1,078$) для получения лимфоконцентрата, в течение 15 минут при 2500 об/мин.
3. Отмывание осадка, содержащего лимфоконцентрат, от посторонних примесей в физиологическом растворе в течение 10 минут при 1200 об/мин.
4. Культивирование лимфоцитов с наночастицами серебра и золота методом параллельных проб и контрольное культивирование с физиологическим раствором в течение 1 часа.
5. Приготовление мазков на предметных стеклах.
6. Просушка мазков в течение 2 часов при комнатной температуре, их фиксация в парах 10% нейтрального формалина (время экспозиции 3 минуты).
7. Промывание в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) в течение 5 минут, ингибирование эндогенной пероксидазы путем обработки 10% раствором перекиси водорода (H_2O_2) в течение 10 минут.
8. Размещение во влажной камере, нанесение 20 мкл специфичных мкАТ на 2 часа таким образом, чтобы реагент был равномерно распределен по всей площади зоны реакции.
9. Промывание в ЗФР (5 минут) и нанесение 20 мкл кроличьей сыворотки против иммуноглобулинов мыши на 1 час.
10. Промывание в ЗФР (5 минут) и нанесение 20 мкл комплекса, состоящего из пероксидазы хрена и антител к пероксидазе хрена (ПАП- комплекс) на 1 час.
11. Обработка 3,3-диаминобензидином тетрахлорида (10 минут) и окрашивание 1% раствором метилового зеленого.
12. Микроскопирование при увеличении объектива $\times 80$, окуляра $\times 15$. Клетки, обладающие выявляемым антигеном связавшимся с пероксидазой хрена, имеют по краю цитоплазмы темный ободок коричневого цвета.

Исследование было проведено *in vitro* с лимфоцитами периферической крови 23 больных вирусной патологией роговой оболочки глаза. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов определялся до и после культивирования с наночастицами серебра.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программы *Statistica 9.0*. Результаты представлены как средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Сравнение полученных данных проведено с использованием непараметрического критерия Ньюмена-Кейлса. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные при изучении изменения уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных с вирусной патологией роговицы после культивирования лимфоцитов с наночастицами серебра, выявили достоверные различия по ряду показателей (табл. 1). Так, при культивировании лимфоцитов с наночастицами серебра уровень экспрессии CD7⁺ достоверно увеличился с 5,5 %; CD25⁺ – на 6,9 %; CD45⁺ – на 7,8 %; фагоцитарная активность нейтрофилов – на 20,9 %.

Изучение влияния наночастиц серебра на уровень экспрессии молекулярного маркера аутоиммунного процесса CD5⁺ и молекулярного маркера апоптоза CD95⁺ показало, что наночастицы серебра значимо не изменяли их значения. Уровень экспрессии на лимфоцитах периферической крови маркеров активации лимфоцитов CD38⁺, CD54⁺ и CD150⁺ после культивирования лимфоцитов с наночастицами серебра также значимо не изменялся.

Таблица 1. Уровень экспрессии маркеров активации лимфоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов у больных вирусными кератитами до и после культивирования с наночастицами серебра ($M \pm SD$), %

Маркеры активации лимфоцитов	Группы исследования, количество больных в каждой группе – 23		P, по Ньюмен-Келсу
	до культивирования с наночастицами	после культивирования с наночастицами серебра	
CD5 ⁺	26,8 ± 4,6	25,4 ± 4,8	> 0,05
CD7 ⁺	21,1 ± 2,8	26,9 ± 3,8	< 0,05
CD25 ⁺	19,4 ± 4,1	26,3 ± 4,5	< 0,05
CD38 ⁺	26,0 ± 5,2	27,5 ± 7,6	> 0,05
CD45 ⁺	22,7 ± 5,4	30,5 ± 4,7	< 0,05
CD54 ⁺	34,4 ± 6,1	36,7 ± 5,2	> 0,05
CD95 ⁺	27,5 ± 6,5	25,1 ± 5,3	> 0,05
CD150 ⁺	21,5 ± 4,9	22,8 ± 4,7	> 0,05
Фагоцитарная активность нейтрофилов	59,3 ± 7,5	80,2 ± 9,4	< 0,01



Выводы

Разработанная в лаборатории иммунологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» методика изучения влияния наночастиц серебра на молекулярный профиль лимфоцитов периферической крови может быть использована в клинической практике для подбора иммуномодулирующей терапии.

Проведенные исследования по изучению воздействия *in vitro* наночастиц серебра на уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови больных вирусными кератитами показали достоверное увеличение уровня экспрессии CD7+, CD 25+, CD 45+ и фагоцитарной активности нейтрофилов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Дрожжина Г.И., Гайдамака Т.Б. Особенности клинического течения и лечения кератита, вызванного вирусом Herpes // Офтальмол. журн. - 2014. - № 2. - С. 21-24.

Пасечникова Н.В., Мальцев Э.В., Мороз О.А. Нанотехнологии, наномедицина, наноофтальмология (Сообщение 1) // Офтальмол. журн. - 2009а. - № 5. - С. 69-76.

Пасечникова Н.В., Мальцев Э.В., Мороз О.А. Нанотехнологии, наномедицина, наноофтальмология (Сообщение 2) // Офтальмол. журн. - 2009б. - № 6. - С. 83-89.

Bayraktar V.N. Specific immune protection to Klebsiella Pneumoniae and Enterococcus faecalis in the chronsc proctstis sufferes // Біологічний вісник МДПУ. - 2013. - №3. - С. 9-23.

REFERENCES

Drozzina, G.I., Gaydamaka, T.B. (2014). Peculiarities of clinical course and herpes virus keratitis treatment. *Ophthalmological Journal*, 2, 21-24.

Pasechnikova, N.V., Maltsev, E.V., Moroz, O.A. (2009a). Nanotechnology, nanomedicine, nano ophthalmology (Report 1). *Ophthalmological Journal*, 5, 69-76.

Pasechnikova, N.V., Maltsev, E.V., Moroz, O.A. (2009b). Nanotechnology, nanomedicine, nano ophthalmology (Report 2). *Ophthalmological Journal*, 6, 83-89.

Bayraktar, V.N. (2013). Specific immune protection to *Klebsiella Pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* in the chronic proctitis sufferers. *Biological Bulletin of Melitopol State Pedagogical University* 3(3), 9-23.

Поступила в редакцию 21.04.2015

Как цитировать:

Ульянов В.А, Величко Л.Н, Богданова А.В, Макарова М.Б. (2015). Изучение влияния наночастиц серебра *in vitro* на уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов и маркера аутоиммунного процесса периферической крови больных вирусной патологией роговицы. *Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета имени Богдана Хмельницкого*, 5 (2), 8-15.

crossref <http://dx.doi.org/10.7905/bbmmpu.v5i1.971>

© *Ульянов, Величко, Богданова, Макарова, 2015*

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)