

Г. Ю. Любимов, Н. К. Зенков, Н. Н. Вольский,  
В. А. Козлов

### ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ МАКРОФАГ- АКТИВИРУЮЩЕГО ФАКТОРА

Институт клинической иммунологии СО АМН СССР, Ново-  
сибирск

Процесс активации макрофагов под воздействием лимфокинов, в частности макрофагаактивирующего фактора (МАФ), представляет собой сложный комплекс цитологических и биохимических изменений, отражающих переход клетки в новое функциональное состояние. В настоящее время общепринятым критерием перехода макрофагов в активированное состояние служит их цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам [4—6]. Этот критерий широко используется в регистрации секреции МАФ стимулированными лимфоцитами [6, 10].

Альтернативой этому весьма трудоемкому и занимающему много времени методу может быть определение продукции макрофагами активированных кислородных метаболитов (АКМ):  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $O_2^1$  и других, в значительной степени определяющих цитотоксическую и бактерицидную функции клеток [1, 4, 5]. Известно, что такие лимфокины, как МАФ и фактор торможения миграции макрофагов, существенно повышают образование АКМ стимулированными макрофагами [6, 11]. При этом действие МАФ и его основного компонента  $\gamma$ -интерферона сопровождается усилением хемилюминесценции (ХЛ) клеток, отражающей повышенную скорость продукции АКМ. На основе регистрации ХЛ макрофагов и моноцитов предложен ряд методов тестирования МАФ [7, 9, 10]. Однако широкое распространение данных методов тормозится недостаточностью и определенной противоречивостью имеющих в литературе данных об оптимальных условиях регистрации ХЛ в активированных макрофагах.

Целью данной работы было сравнительное исследование изменений хемилюминесцентного ответа с разными люминофорами и стимуляторами продукции АКМ в перитонеальных макрофагах мыши после воздействия МАФ.

**Методика исследования.** В работе использованы мышигибриды  $F_1$  (СВА $\times$ С57В1/6) из питомника АМН СССР «Столбовая» массой 16—18 г. Культивирование клеток проводили в среде RPMI 1640 производства НПО «Вектор» с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 15 мкг/мл гентамицина.

МАФ получали в виде супернатанта стимулированных канавалином А (Кона) спленоцитов. С этой целью селезенки мышей гомогенизировали в культуральной среде с добавлением  $5 \cdot 10^{-7}$  М 2-меркаптоэтанола («Serva») и 10 мМ НЕРЕС («Serva»), клеточную суспензию разбавляли до концентрации  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл и инкубировали в присутствии 5 мкг/мл Кона («Pharmacia») при 37 °С и 95 % влажности в атмосфере 5 %  $CO_2$  в течение 48 ч. После инкубации супернатанты фильтровали через миллиметровые фильтры (размер пор 0,45 мкм) и хранили в замороженном состоянии при  $-20$  °С.

Для получения перитонеальных макрофагов мышам внутривентрально вводили по 1 мл 6 % тиогликолевого бульона. Через 3 сут брюшную полость мышей промывали охлажденной средой 199, клетки дважды отмывали и ресуспендировали в концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл в среде культивирования.

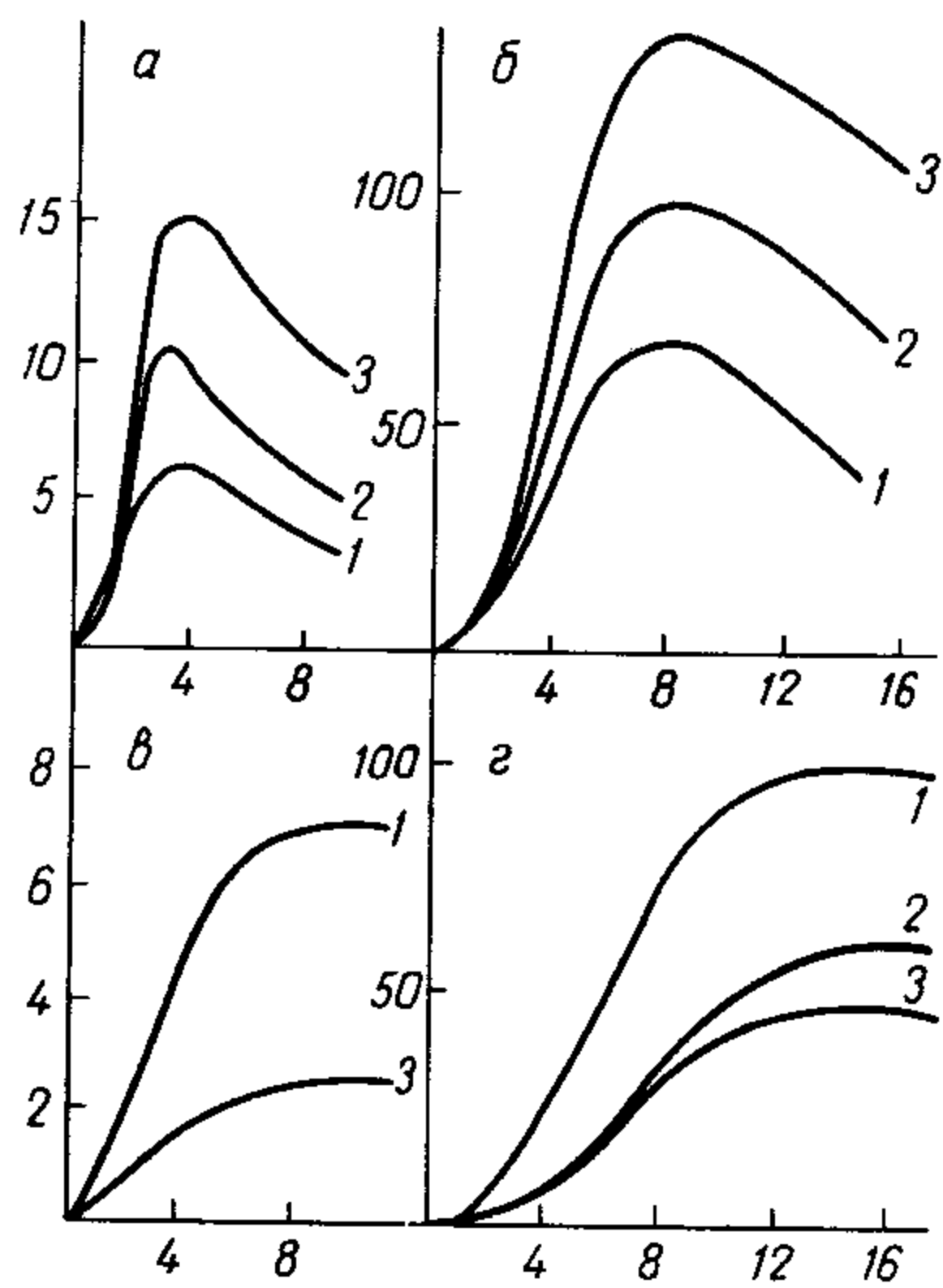


Рис. 1. Интенсивность хемилюминесцентного ответа с люминолом (а, б) и люцигенином (в, г) перитонеальных макрофагов мыши при стимуляции ФМА (а, в) или опсонизированным зимозаном (б, г) после 20 ч инкубации с МАФ.

Содержание супернатанта КонА-стимулированных лимфоцитов в среде инкубации: 1—0; 2—1%; 3—10%. По осям абсцисс — время с момента добавления стимулятора, мин; по осям ординат — интенсивность ХЛ, имп/(с·10<sup>4</sup>).

Суспензию клеток разливали по 2 мл в пластиковые чашки диаметром 40 мм, после 1 ч инкубации неприлипшие клетки удалялись двукратным промыванием средой, к полученному монослою макрофагов добавляли 2 мл культуральной среды, содержащей различные концентрации МАФ, и культивировали при 37 °С и 95 % влажности в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 4, 18, 12 или 20 ч.

ХЛ измеряли на хемилюминометре «Фотон» производства СОПКТБ СО ВАСХНИЛ. Для этого пластиковые чашки с монослоем клеток дважды промывали раствором Хенкса без фенолового красного, добавляли 2 мл этого раствора и помещали в термостатированную при 37 °С ячейку хемилюминометра. После 5 мин термостатирования в чашки добавляли 0,5 мл 10<sup>-3</sup> М раствора люминола («Serva») или люцигенина («Reanal») и в течение 3 мин регистрировали спонтанную ХЛ. Затем макрофаги стимулировали добавлением 0,5 мл раствора (2,5 мкг/мл) форболмирилатацетата (ФМА; «Sigma») или 0,2 мл суспензии (20 мг/мл) зимозана (Олайнский завод биопрепаратов), опсонизированного сывороткой мышей. После добавки стимулятора регистрировали интенсивность ХЛ до наступления максимума свечения.

Скорость восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве стимулятора макрофагов опсонизированный зимозан. Для этого перитонеальные макрофаги инкубировали при 37 °С в ячейках плоскодонного 96-луночного планшета по 2,5·10<sup>5</sup> клеток на лунку в присутствии зимозана (2 мг/мл) и НСТ (0,3 мг/мл; «Serva»). Через 40 мин инкубации реакцию останавливали добавлением 20 мкл 5 М HCl, недосадочную жидкость отбрасывали и образовавшийся формазан растворяли в 0,1 мл диметилсульфоксида, после чего измеряли оптическую плотность полученных растворов на приборе «Мультискан» («Flow Laboratory») при длине волны 670 нм. Скорость восстановления НСТ выражали в условных единицах.

**Результаты и обсуждение.** Собственное свечение монослоя макрофагов было слабым

(около 200 имп/с). При добавлении люминофора свечение возрастало в 5—10 раз, но не наблюдалось выраженной вспышки свечения после добавления люминола, как было обнаружено в работе S. Mito и соавт. [10]. По-видимому, расхождение в результатах можно объяснить методическими особенностями регистрации ХЛ, так как авторы указанной работы предварительно инкубировали макрофаги с МАФ в комбинации с липополисахаридом и добавляли люминол в процессе смены среды, так что зарегистрированная ими вспышка свечения может быть результатом изменения рН.

Стимуляция макрофагов ФМА или зимозаном вызывала резкое усиление свечения, максимум которого наступал через 3—5 мин при стимуляции ФМА и 7—10 мин при стимуляции зимозаном (рис. 1). Хемилюминесцентные ответы с люминолом и люцигенином были похожими, хотя максимум свечения с люцигенином затягивался и был менее выражен. Инкубирование макрофагов с МАФ приводило к изменению интенсивности как спонтанной, так и стимулированной ХЛ без изменения временной динамики (см. рис. 1). Для оценки воздействия МАФ применяли выраженное в процентах отношение максимальной интенсивности ХЛ к соответствующему значению, полученному в контрольных пробах без добавления МАФ.

Относительные изменения интенсивности ХЛ перитонеальных макрофагов с разными люминофорами и стимуляторами после инкубации с МАФ представлены в таблице. Как видно из таблицы, наиболее быстро реагирует на действие МАФ спонтанная ХЛ с люминолом: уже после 4 ч инкубации с МАФ она возрастает в 1,5 раза. Вероятно, этот параметр можно использовать для быстрых методов тестирования МАФ в биосубстратах.

Воздействие МАФ на люминолзависимую ХЛ при стимуляции макрофагов ФМА и зимозаном возрастало с увеличением времени инкубации с МАФ (см. таблицу), достигая наибольших значений после 20 ч инкубации. При использовании в качестве стимуляторов ФМА и зимозана относительные изменения интенсивности ХЛ приблизительно равны, но поскольку интенсивность ХЛ при стимуляции зимозаном значительно выше, то именно этот стимулятор предпочтителен для выявления активированного состояния макрофагов и регистрации эффекта МАФ.

Противоположный по знаку эффект воздействия МАФ был обнаружен при измерении люцигенинзависимой ХЛ (см. рис. 1, в, г; таблицу): существенно не изменяя интенсивность ХЛ в первые 12 ч инкубации, воздействие МАФ значительно снижало уровень ХЛ через 20 ч инкубации. Различие изменений люминол- и люцигенинзависимой ХЛ

Изменение интенсивности ХЛ перитонеальных макрофагов после разных сроков инкубации с МАФ (% контроля)

Время инкубации, ч	ХЛ с люминолом			ХЛ с люцигенином		
	без стимулятора	ФМА	зимозан	без стимулятора	ФМА	зимозан
4	151±19*	102±6	114±6	110±16	102±29	104±21
8	161±19*	181±21*	154±14*	128±38	108±25	112±8
12	166±34	182±23*	181±13**	81±6*	66±23	107±24
20	234±47*	228±31**	225±30**	59±17	38±16*	59±11*

Примечание. Во всех случаях макрофаги инкубировались в среде, содержащей 10 % супернатанта КонА-стимулированных лимфоцитов. Представлены средние значения по 5 измерениям. \* — p<0,05, \*\* — p<0,01.

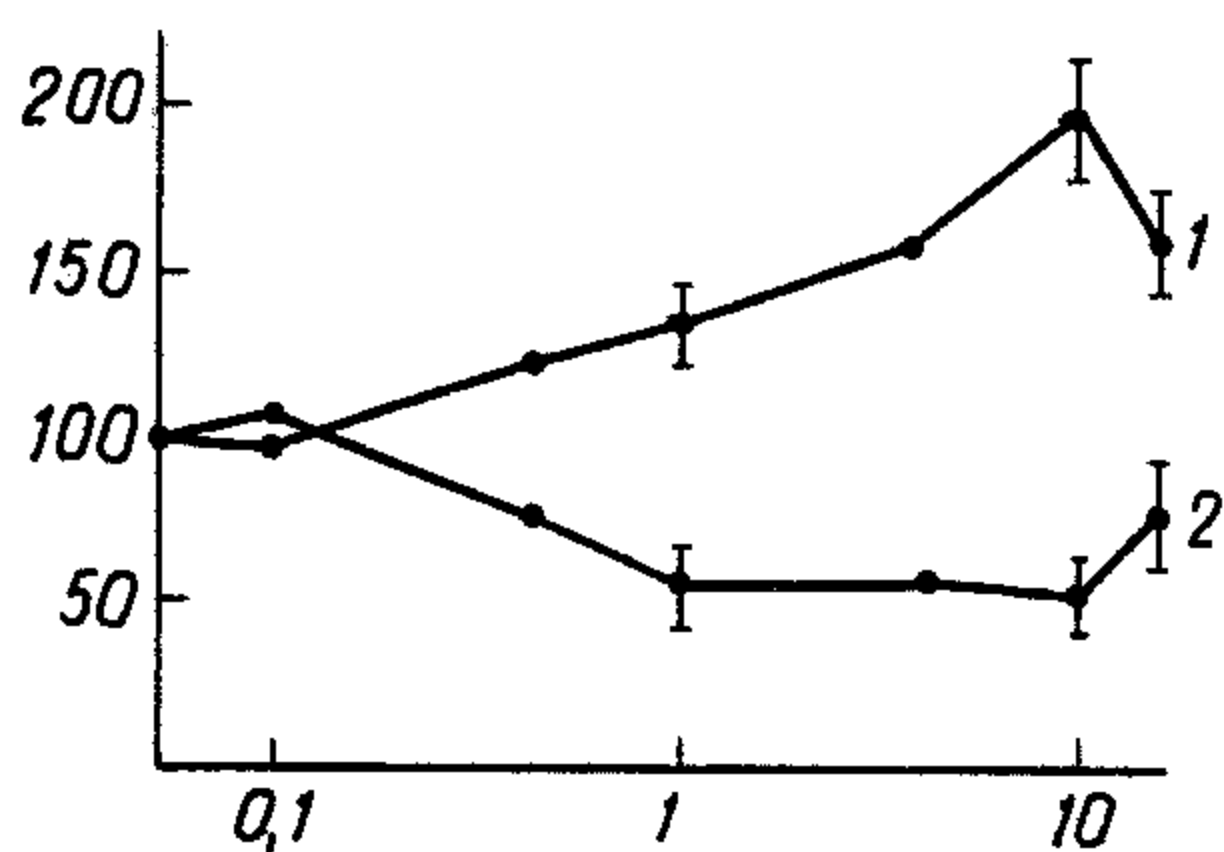


Рис. 2. Относительные изменения интенсивности хемилюминесцентного ответа с люминолом (1) и люцигенином (2) при стимуляции макрофагов зимозаном в зависимости от содержания МАФ в инкубационной среде (инкубация с МАФ в течение 20 ч).

По оси абсцисс — содержание МАФ в инкубационной среде, %; по оси ординат — изменение интенсивности ХЛ, % контроля.

макрофагов при действии МАФ, вероятно, определяется различиями в механизмах возникновения свечения данных люминофоров. Свечение люцигенина возникает при взаимодействии с супероксидным радикалом ( $O_2^-$ ) и главным образом отражает внеклеточную продукцию  $O_2^-$ , так как молекулы люцигенина плохо проникают через клеточную мембрану [1, 3]. В отличие от люцигенина свечение люминола наблюдается при взаимодействии с разными формами АКМ ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $HOCl$ ) и он легко проникает внутрь клеток [1, 12]. Таким образом, снижение интенсивности ХЛ с люцигенином указывает на уменьшение внеклеточной концентрации  $O_2^-$ .

Для оценки суммарной концентрации  $O_2^-$  было исследовано восстановление НСТ, который хорошо проникает через клеточную мембрану и реагирует как с вне-, так и с внутриклеточной фракцией  $O_2^-$ . Было обнаружено, что воздействие на макрофаги МАФ в течение 20 ч значительно снижает уровень восстановления НСТ (на 40% при стимуляции зимозаном). Следовательно, МАФ уменьшает не только внеклеточную, но и суммарную концентрацию  $O_2^-$ , продуцируемого макрофагами.

Одной из возможных причин разнонаправленных изменений концентрации  $O_2^-$  и других форм АКМ (и как следствие — ХЛ с люминолом и люцигенином) может быть увеличение активности супероксиддисмутазы (СОД). При воздействии МАФ обнаружено увеличение активности СОД [11], что может приводить к ускорению дисмутации  $O_2^-$  в  $H_2O_2$ , снижая концентрацию  $O_2^-$  и одновременно повышая концентрацию  $H_2O_2$ . Поскольку известно, что  $O_2^-$  стимулирует пролиферацию лимфоцитов [2], а  $H_2O_2$  дает противоположный эффект [1, 2], можно предположить, что индуцирующее влияние МАФ, выделяемого стимулированными лимфоцитами, на уровень СОД в макрофагах и изменение вследствие этого соотношения между  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  в пользу ингибирующего пролиферацию лимфоцитов агента имеют приспособительный характер и опосредуют отрицательную обратную связь в процессе развития иммунного ответа.

Для того, чтобы выяснить возможность использования хемилюминесцентного метода для определения количества МАФ в супернатантах стимулированных лимфоцитов, была измерена интенсивность ХЛ макрофагов в зависимости от кон-

центрации МАФ в среде инкубации (рис. 2). Как видно из рис. 2, наблюдается разнонаправленное изменение интенсивности ХЛ с люминолом с люцигенином при возрастании концентрации МАФ в инкубационной среде с 0,1 до 10%. При этом интенсивность ХЛ с люминолом увеличивалась с возрастанием концентрации МАФ до 10%, а ХЛ с люцигенином снижалась до некоторого предела (приблизительно в 2 раза) при концентрации МАФ, равной 1%, и затем практически не изменялась при ее увеличении до 10%. Повышение концентрации МАФ в среде инкубации макрофагов до 15% приводило к уменьшению его влияния на интенсивность ХЛ как с люминолом, так и с люцигенином. Представленные на рис. 2 изменения хемилюминесцентного ответа макрофагов под воздействием МАФ близки к тем зависимостям доза — эффект, которые получаются при тестировании МАФ по его влиянию на цитотоксическую активность макрофагов. Такое сходство говорит о том, что регистрируемые изменения ХЛ стимулированных макрофагов хорошо отражают их переход в активированное состояние и могут использоваться для тестирования МАФ в биосубстратах.

## Выводы

1. Воздействие МАФ на перитонеальные макрофаги мыши приводит к ослаблению люцигенин-зависимой ХЛ и усилению люминолзависимой ХЛ макрофагов, что отражает снижение уровня  $O_2^-$  и повышение уровня других форм АКМ, таких, как  $H_2O_2$ , при переходе клеток в активированное состояние.

2. Изменение интенсивности хемилюминесцентного ответа стимулированных макрофагов зависит от концентрации МАФ в среде инкубации и может служить критерием оценки содержания МАФ в супернатантах стимулированных лимфоцитов.

3. Оптимальными условиями для регистрации перехода макрофагов в активированное состояние под влиянием МАФ хемилюминесцентным методом являются использование люминола в качестве люминофора и опсонизированного зимозана в качестве стимулятора макрофагов, а также инкубация макрофагов с МАФ в течение 20 ч.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Шерстяев М. П. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика.— М., 1989.— Т. 24.— С. 1—176.
2. Вольский Н. Н., Кашлакова Н. В., Козлов В. А. // Цитология.— 1988.— Т. 30.— С. 898—902.
3. Зенков Н. К., Куликов В. Ю. // Лаб. дело.— 1985.— № 1.— С. 43—45.
4. Ломакин М. С. Иммунологический надзор.— М., 1990.
5. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.— Новосибирск, 1989.
6. Маянский Д. Н., Цырендоржиев Д. Д. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 109, № 3.— С. 352—368.
7. Gree I. A., Blair A. L., Beck J. S. // J. biol. Chem.— 1989.— Vol. 3.— P. 71—74.
8. Ito M., Karmali R., Krim M. // Immunology.— 1985.— Vol. 56.— P. 533—541.
9. Muto S., Igarashi K., Matsumoto Y. et al. // J. immunol. Meth.— 1986.— Vol. 90.— P. 51—56.
10. Muto S., Ogino H., Yuki H. // Ibid.— 1988.— Vol. 111.— P. 51—59.
11. Nakagawara A., De Santis N. M., Nogueira N. et al. // J. clin. Invest.— 1982.— Vol. 70.— P. 1042—1048.
12. Seim S. // Acta path. microbiol. immunol. scand. Sect. C.— 1983.— Vol. 91.— P. 123—128.

Поступила 28.02.91

CHEMILUMINESCENCE OF PERITONEAL MACROPHAGES  
UNDER THE ACTION OF MACROPHAGE ACTIVATING  
FACTOR. *G. Yu. Lyubimov, N. K. Zenkov, N. N. Volsky,  
V. A. Kozlov*

The effect of macrophage-activating factor on chemiluminescence response of mouse macrophages was studied. It was shown that macrophage transition into the activated state resulted in a decrease of lucigenin-dependent and an increase of luminol-dependent chemiluminescence, that have evidenced a low superoxide radical level and high levels of other forms of activated oxygen metabolites, mainly hydrogen peroxide, in macrophage culture. Optimal conditions for recording the macrophage activating factor in the supernatants of stimulated lymphocytes by chemiluminescence were determined.