

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**ОППОЗИТНЫЕ ВАРИАНТЫ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ TH1-
И TH2-ЗАВИСИМЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

© 2009 г. В.О. Ткачев, Н.Н. Вольский, О.Т. Кудаева, Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман,
О.П. Колесникова, В.А. Козлов

ГУ НИИ Клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Поступила: 02.07.2009. Принята: 05.08.2009

На ранних сроках (0–2 недели) после индукции хронической РТПХ, вызванной трансплантацией лимфоидных клеток в полуаллогенной системе DBA/2 → (C57Bl6xDBA/2)F1 и развивающейся по двум оппозитным вариантам (Th1- и Th2-зависимому), отмечено увеличение продукции оксида азота и угнетение активности аргиназы в перитонеальных макрофагах, что свидетельствует об их активации по классическому механизму. На поздних сроках (более 20 недель) Th2-зависимый вариант хронической РТПХ характеризуется альтернативной активацией макрофагов (с высокой активностью аргиназы), тогда как Th1-вариант – классической активацией (с усилением продукции NO). Полученные данные свидетельствуют о важной роли метаболического статуса макрофагов, тесно связанного с механизмом их активации, в патогенезе РТПХ-индуцированных иммунопатологических состояний.

Ключевые слова: макрофаги, хроническая РТПХ, аргиназа, оксид азота

ВВЕДЕНИЕ

В современной иммунологии сложилась концепция, предусматривающая наличие классического и альтернативного механизмов активации макрофагов, ведущих к их дифференцировке в фенотипически и функционально различные типы клеток (M1- и M2-макрофаги, соответственно). При активации макрофагов их дифференцировка в M1-клетки вызывается, главным образом, провоспалительными цитокинами Th1-профиля (в частности, IFN γ) в сочетании с неспецифическими стимулами, такими, как бактериальные липополисахариды. Классически активированные макрофаги играют важную роль в защите организма от большинства вирусных и бактериальных инфекций, а также противоопухолевом иммунитете [1]. Дифференцировка макрофагов в M2-клетки осуществляется противовоспалительными цитокинами Th2-профиля (IL-4, IL-13 и IL-10), иммунными комплексами, глюкокортикоид-

ными гормонами и другими агентами. Данная субпопуляция макрофагов обеспечивает фазу разрешения воспалительного процесса и репарацию тканей, стимулирует гуморальный (Th2-зависимый) иммунный ответ [2]. Важным отличительным признаком оппозитных субпопуляций активированных макрофагов являются особенности метаболизма аминокислоты L-аргинина [3]. M1-клетки характеризуются высокой активностью NO-синтазы и, следовательно, высоким уровнем продукции оксида азота, обуславливающим их цитотоксические и цитостатические свойства. В M2-клетках L-аргинин метаболизируется преимущественно аргиназой с образованием мочевины, а также L-пролина и полиаминов, которые стимулируют клеточную пролиферацию и фиброгенез, что имеет важное значение для процессов репарации [4].

Предполагается наличие функциональной взаимосвязи между вариантами активации макрофагов и Th1/Th2-балансом в иммунной системе, однако для выяснения характера и механизма этого взаимодействия необходимо изучение этого феномена в различных экспериментальных моделях. Одной из таких моделей, еще не исследованной в данном отноше-

нии, является реакция трансплантат против хозяина, индуцированная переносом лимфоидных клеток от мышей линии DBA/2 гибридам первого поколения (C57Bl/6хDBA/2)F1. Ранее нами было показана возможность ее спонтанного развития по двум иммунопатологическим вариантам, связанным с преимущественной активацией Th1- или Th2-звена иммунной системы [5–7]. Первый вариант (Th1-зависимый) характеризуется угнетением гуморальных иммунных реакций, а второй (Th2-зависимый) сопровождается формированием аутоиммунного иммунокомплексного гломерулонефрита на фоне иммуносупрессии. Таким образом, оппозитные варианты развития хронической РТПХ, индуцированной в данной полуаллогенной системе, могут быть использованы в качестве моделей Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояний.

Исходя из этого, в данной работе исследованы особенности метаболического состояния макрофагов (связанного с механизмом их активации) на различных сроках хронической РТПХ, развивающейся по Th1- или Th2-зависимому вариантам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали мышей линий DBA/2 и гибридов первого поколения (C57Bl/6хDBA/2)F1 (B6D2F1), самок, в возрасте 2–6 месяцев, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН.

Индукция хронической реакции трансплантат против хозяина и определение ее иммунопатологического варианта

РТПХ индуцировали у мышей путём переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2. Клетки селезёнки вводили реципиентам внутривенно в дозе 65×10^6 клеток двукратно с интервалом в 5 дней [8]. В качестве контроля использовали интактных самок B6D2F1 того же возраста. О развитии гломерулонефрита, характеризующего Th2-зависимый вариант развития РТПХ, судили по появлению стойкой протеинурии (не менее 3 мг/мл в двух последовательных измерениях). Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Coomassie Blue (Loba Feinchemie, Австрия) на

длине волны 570 нм. Калибровочную кривую строили по стандартным растворам БСА (Sigma, США)

Выделение и культивирование резидентных перитонеальных макрофагов

Мышам после декапитации в полость брюшины вводили 10 мл холодной культуральной среды RPMI-1640 (ГНЦ ВБ Вектор) с 1% фетальной бычьей сывороткой (FCS; Биолот), через 2 минуты клетки перитонеального экссудата извлекали при помощи шприца. Полученные клетки отмывали центрифугированием и культивировали в 96-луночной планшете (Orange scientific, Бельгия) по 200×10^3 клеток на лунку в течение 2 часов в полной культуральной среде, приготовленной на основе RPMI-1640 (без фенолового красного) и содержащей 10% FCS, 15 мМ HEPES (Sigma, США), 0,3% L-глутамин (ГНЦ ВБ Вектор). После этого неприлипающую фракцию удаляли двукратной отмывкой теплой средой RPMI-1640. Полученные таким образом перитонеальные макрофаги культивировали в течение 24 часов (для определения активности аргиназы), либо 48 часов (для определения продукции оксида азота) в полной культуральной среде. Для активации NO-синтазы в начале культивирования добавляли LPS (E. Coli B5:055) в конечной концентрации 10 мкг/мл (Sigma, США) и LPS в сочетании с IFN γ . В качестве источника IFN γ использовали супернатант смешанной культуры лимфоцитов, полученным стандартным методом [9].

Продукцию оксида азота оценивали по содержанию нитритов в супернатанте клеточных культур [10]. Для этого спустя 48 часов из лунок культурального планшета отбирали по 100 мкл супернатанта и смешивали с равным объемом реактива Грисса (Fluka, Швейцария). Пробы выдерживали в темноте 15 минут, после чего определяли оптическую плотность при длине волны 540 нм.

Активность аргиназы определяли микрометодом по скорости образования мочевины из экзогенного L-аргинина [11]. Для этого макрофаги лизировали 0,1% раствором Triton X100, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием на водяной бане при +57°C в течение 10 минут, добавляли к пробам по 100 мкл 0,5 М раствора L-аргинина и инкубировали их 1 час при +37°C. Реакцию оста-

наливали добавлением $H_2SO_4/H_3PO_4/H_2O$ (в объемном соотношении 1:3:7). Концентрацию мочевины определяли колориметрически при длине волны 540 нм после добавления 9% спиртового раствора альфа-изонитропропиофенона (Sigma, США) и нагревания на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Результат выражали в mU активности фермента. За 1 U активности аргиназы принимали количество фермента, синтезирующего 1 ммоль мочевины в минуту.

Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Отличия между сравниваемыми величинами показателей различных экспериментальных групп считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты на графиках и в таблицах приведены в виде средних величин.

Работа выполнена с использованием технической базы Центра коллективного пользования СО РАМН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукцию оксида азота и активность аргиназы исследовали на 3, 5, 9 и 12 сутки после начала индукции хронической РТПХ. Было установлено, что на 9 сутки, то есть через 48 часов после второй трансплантации полуаллогенных лимфоцитов, достоверно увеличивается как спонтанная, так и LPS- и LPS/IFN γ -стимулированная продукция оксида азота макрофагами (Таб. 1). В этот срок впервые уровень спонтанной продукции NO достигает величины, которая может быть достоверно измерена используемым методом. Также возрастает уровень LPS/IFN γ -стимулированной продукции NO (на 62% по сравнению с интактными животными), но особенно резко (более чем втрое) увеличивается его LPS-стимулированная продукция. Эти данные можно объяснить изменениями концентраций про- и противовоспалительных цитокинов в

Таблица 1. Продукция оксида азота (в мкМ нитритов) на ранних сроках хронической РТПХ

Стимулятор продукции NO	Сроки после начала индукции хронической РТПХ (сутки)				
	Контроль	3	5	9	11
—	0	0	0	6*	0
LPS	11,2	14,3	4,9	32,4*	12,8
LPS/IFN γ	39,9	60,7	26,5	64,5*	48

* различия между показателями экспериментальных и контрольных групп достоверны с $p < 0,05$.

Таблица 2. Активность аргиназы (в mU) на ранних сроках развития хронической РТПХ

Сроки после начала индукции хронической РТПХ (сутки)				
Контроль 580	3 415	5 410	9 390	11 410

сыворотке крови в процессе развития хронической РТПХ. Согласно данным других авторов, однократный перенос полуаллогенных лимфоидных клеток приводит через 24–48 часа к увеличению синтеза провоспалительных цитокинов (IL-2 и IFN γ), после чего их количество в сыворотке крови снижается, тогда как продукция Th2-ассоциированных цитокинов начинает с этого времени возрастать [12, 13]. Следует отметить, что наблюдаемая нами 3 сутки (48 часов после первого переноса клеток) выраженная тенденция к увеличению LPS- и LPS/IFN γ -стимулированной продукции также хорошо согласуется с данными о динамике продукции цитокинов на ранних этапах хронической РТПХ.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что на протяжении всей начальной фазы развития хронической РТПХ существует тенденция к снижению аргиназной активности.

На поздних сроках хронической РТПХ (4–5 месяцев) активности NO-синтазы и аргиназы, регистрируемые в перитонеальных макрофагах, существенно отличаются при различных вариантах иммунопатологического состояния. LPS/IFN γ -стимулированная продукция NO макрофагами была достоверно выше (на 46%)

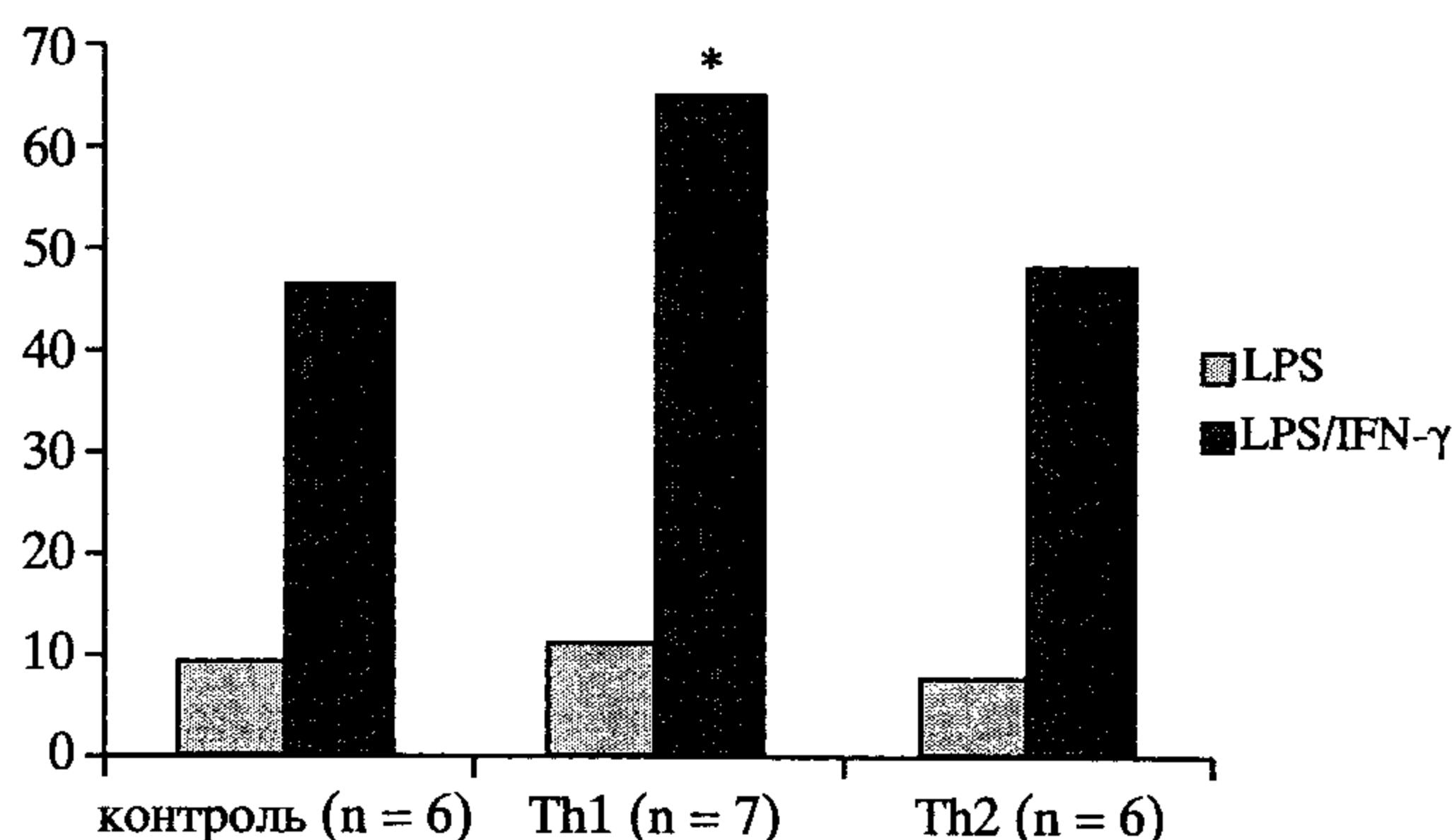


Рис. 1. LPS- и LPS/IFN γ -стимулированная продукция оксида азота при Th1- и Th2-зависимых вариантах хронической РТПХ

По оси ординат: концентрация нитритов (мкМ)

* различия между показателями экспериментальных и контрольных групп достоверны с $p < 0,05$

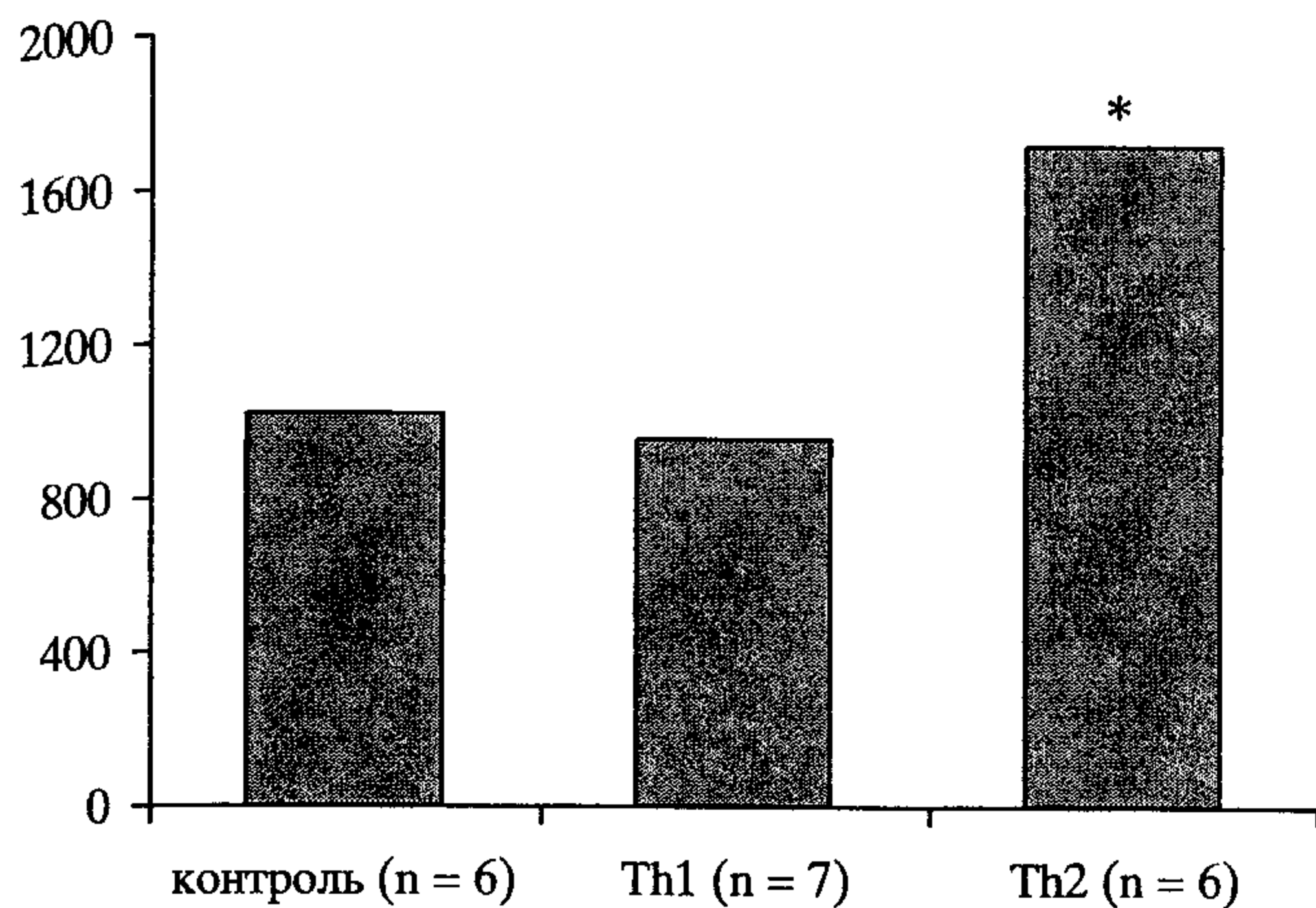


Рис. 2. Активность аргиназы при Th1- и Th2-зависимых вариантах хронической РТПХ

По оси ординат: активность аргиназы (mU)

* различия между показателями экспериментальных и контрольных групп достоверны с $p < 0,05$

в группе мышей с Th1-зависимым вариантом течения хронической РТПХ по сравнению с группой животных с оппозитным вариантом течения (Рис. 1). В тоже время показатели LPS-стимулированной продукции оксида азота в этих группах достоверно не отличались друг от друга, а уровни его спонтанной продукции находились ниже порога чувствительности метода. Активность макрофагальной аргиназы, напротив, была повышена на 83% при Th2-зависимом варианте развития хронической РТПХ (Рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на большой разброс исследуемых параметров на раннем этапе развития хронической РТПХ не наблюдается разделения экспериментальных животных на отдельные группы, свидетельствующее о поляризации иммунных процессов. Надо полагать, что в эти сроки процесс развивается однотипно у всех реципиентов полуаллогенных клеток, и это отражается в однонаправленных изменениях метаболического состояния макрофагов.

В то же время, полученные данные свидетельствуют о различных механизмах активации макрофагов при РТПХ-индуцированных Th1- и Th2-зависимых иммунопатологических состояниях. Для Th1-зависимого варианта характерна классическая активация макрофагов, характеризующаяся преобладанием NO-синтазной активности, тогда как для оппозитного варианта хронической РТПХ характерна альтернативная активация макрофагов с высокой активностью аргиназы.

Использование в качестве объекта исследования перитонеальных макрофагов, непосредственно не связанных с воспалением ткани почек, позволяет говорить, что обнаруженные нами различия в метаболическом состоянии клеток носят системный характер и характерны для всех отделов иммунной системы.

Активация макрофагов по тому или иному механизму может являться важным звеном в патогенезе состояний, изучаемых на данной модели. Для Th2-зависимого варианта хронической РТПХ характерно образование циркулирующих иммунных комплексов, содержащих аутоантигены (преимущественно ДНК и ядерных нуклеопротеиды) и откладывающихся в клубочках почек, вызывая их повреждение. При этом альтернативная активация макрофагов иммунными комплексами через Fcγ-рецепторы приводит к усилению их способности стимулировать гуморальные иммунные реакции и, соответственно, синтез аутоантител [14, 15]. Увеличение аргиназной активности в альтернативно активированных макрофагах может, за счет возрастания синтеза полиаминов, поддерживать высокую пролиферативную активность клеток-антителопродуцентов при их поликлональной активации [4]. Кроме того, в очагах воспаления увеличение аргиназной активности в клетках макрофагального ряда (мезангиальных клетках клубочков почек) способствует развитию пролиферативных форм гломерулонефрита и увеличению синтеза коллагена, приводящему к гломерулосклерозу. Также показано, что снижение продукции оксида азота клетками, инфильтрирующими клубочки почек при гломерулонефрите, вызванное различными факторами, приводит к локальным нарушениям клубочковой гемодинамики и усиливает протеинурию [16, 17].

Высокая активность NO-синтазы в макрофагах при Th1-зависимом варианте хронической РТПХ, напротив, снижает пролиферацию T- и B-лимфоцитов и усиливает апоптоз активированных лимфоцитов, что препятствует развитию аутоиммунного процесса. Важным звеном в иницировании хронической РТПХ в ее Th2-зависимой форме считается потеря контроля за B-клетками, активированными собственными антигенами, со стороны цитотоксических лимфоцитов [18]. Увеличение макрофагами продукции NO, в больших дозах оказывающего на лимфоциты цитотоксическое и апоптогенное действие,

возможно, частично «замещает» нарушенные функции Т-киллеров у мышей линии DBA/2, для которых характерны дефекты клеточного звена иммунитета (низкий уровень CD8⁺ лимфоцитов и нарушенная продукция IFN γ). Кроме того, известно, что оксид азота способствует поляризации Th0-клеток в Т-хелперы первого типа [19].

Таким образом, изменения метаболического состояния макрофагов, тесно связанные с механизмами их активации, могут не только свидетельствовать о доминировании Th1-либо Th2-звена иммунитета, но и в свою очередь оказывать влияние на Th1/Th2-баланс в организме, частично определяя выбор варианта развития хронической РТПХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, полученные нами на модели хронической РТПХ, подтверждают наличие тесной ассоциации между Th1/Th2-зависимыми патологическими состояниями и соотношением оппозитных субпопуляций активированных макрофагов. Дальнейшее изучение этой и подобных экспериментальных моделей должно выявить причинно-следственные связи между Th1/Th2-балансом в иммунной системе и механизмами активации макрофагов, что позволит оценить возможность модуляции иммунных реакций и иммунокоррекции за счет воздействия на метаболический статус макрофагов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. et al.* Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008, 13, 453–461.
2. *Gordon S.* Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3(1), 23–35.
3. *Mills C., Kincaid K., Alt J. M. et al.* Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* 2000, 164(12), 6166–6173.
4. *Morris S.M.Jr.* Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutrition* 2007, 137(6 Suppl 2), 1602–1609.
5. *Козлов В.А., Кугаева О.Т., Колесникова О.П. и др.* Th1 и Th2-зависимые варианты хронической реакции трансплантат против хозяина. *Иммунология* 2002, 3, 143–147.
6. *Кугаева О.Т., Колесникова О.П.* Патологические механизмы иммунных нарушений и баланс про- и противовоспалительных цитокинов: модель РТПХ. В кн.: Система цитокинов. Теоретические и клинические аспекты (под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова). Новосибирск 2004, 255–268.
7. *Кугаева О.Т., Гойман Е.В., Лыков А.П. и др.* Влияние препаратов, изменяющих соотношение Th1/Th2, на частоту развития клинических вариантов хронической реакции трансплантат против хозяина. *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2005, 9, 325–327.
8. *Kimura K., Ida, Shimada K., Kanai Y.* Specificity of anti-nuclear antibodies induced in F1 mice undergoing the graft versus host reaction: isotypes and cross-reactivities. *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 69, 385–393.
9. *Селедцов В.И., Перминова О.М.* Колориметрический метод определения активности макрофагаактивирующего фактора. *Иммунология*, 1991, 2, с 69-70.
10. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982, 126(1), 131–138.
11. *Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M.* Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 1994, 174(1–2), 231–235.
12. *Garlisi C.G., Pennline K.J., Smith S.R. et al.* Cytokine gene expression in mice undergoing chronic graft-versus-host disease. *Mol. Immunol.* 1993, 30, 669–677.
13. *Rus V., Svetic A., Nguyen P. et al.* Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-vs-host disease. Regulatory role of donor CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 1995, 155(5), 2396–2406.
14. *Anderson C.F., Mosser D.M.* Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 2002, 168(8), 3697–3701.
15. *Anderson C.F., Mosser D.M.* A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 72(1), 101–106.
16. *Cattell V.* Nitric oxide and glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2002, 61(3), 816–821.
17. *Waddington S.N.* Arginase in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2002, 61(3), 876–881.
18. *Shustov A., Nguyen P., Finkelman F. et al.* Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8⁺ T-cell activation and IFN-gamma production. *J. Immunol.* 1998, 161, 2848–2855.
19. *Niedbala W., Wei X.Q., Piedrafita D. et al.* Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29, 2498–2505.

OPPOSITE VARIANTS OF MACROPHAGE ACTIVATION IN EXPERIMENTAL TH1- AND TH2-DEPENDENT IMMUNOPATOLOGIES

**V.O. Tkachev, N.N. Volsky, O.T. Kudaeva, E.D. Gavrilova, E.V. Goiman,
O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov**

*Research Institute of Clinical Immunology of Siberian branch Russian Academy of Medical
Science, Novosibirsk, Russia*

At early stage of chronic Graft-versus-Host Disease (GVHD) (0–2 week after induction), initiated by lymphoid cells transplantation in semiallogenic system DBA/2 → (C57Bl6xDBA/2)F1 and leading to two opposite variants (Th1- and Th2-depending), we found increase of nitric oxide production and decrease of arginase activity. At late stage (more, than 20 weeks) Th2-dependent variant of chronic GVHD is characterizes by alternative macrophage activation (with arginase activity prevalence), while Th1-dependent variant – classic macrophage activation (with NO production prevalence). This data indicate important role of macrophages' metabolic state in GVHD-induced immunopathologies.