

## ИММУНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

### ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ДЕКСТРАНОВ НА NO-СИНТАЗНУЮ И АРГИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

В.О.Ткачев, О.П.Колесникова\*, А.В.Троицкий, В.А.Шкурупий

Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН; \*ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Изучено влияние окисленных декстранов с молекулярной массой 30-35 кД и 60-65 кД на NO-синтазную и аргиназную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях *in vivo* и *in vitro*. Окисленные декстраны вне зависимости от молекулярной массы в условиях *in vivo* и *in vitro* сдвигают NO-синтаза/аргиназный баланс в сторону преобладания продукции NO. Введение исследуемых веществ интактным мышам существенно увеличивает активность NO-синтазы, тогда как культивирование макрофагов в присутствии модифицированных декстранов снижает активность аргиназы в клетках. Изученные эффекты окисленных декстранов способствуют преимущественной стимуляции Th1-опосредованных клеточных иммунных реакций.

**Ключевые слова:** окисленные декстраны, макрофаги, оксид азота, аргиназа

Одна из актуальных задач современной фармакологии — адресная доставка биологически активных соединений — может быть реализована путем использования высокомолекулярных биосовместимых и биодеградируемых матриц-носителей фармакологических средств, способных модулировать функции иммунокомпетентных клеток, в частности, клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

Такие носители модифицированы путем окисления декстраны, эффективно поглощаются макрофагами и гидролизуются лизосомальными ферментами [2], что сопровождается разными изменениями метаболизма макрофагов.

Установлено, что соотношение между альтернативными путями метаболизма аргинина — NO-синтазным и аргиназным — в значительной степени определяет способность макрофагов стимулировать клеточные (Th1-зависимые) или гуморальные (Th2-зависимые) иммунные реакции [6,7]. Таким образом, вещества, изменяющие NO-синтаза/аргиназный баланс, могут быть использованы для модуляции иммунного ответа и коррекции его нарушений. Увеличение продукции NO за счет активации индуцибельной NO-синтазы является ключевым звеном в пато-

генезе вызванного сульфатированными декстранами язвенного колита [4,9] и в формировании декстраниндуцированных легочных гранулем [11]. Согласно другим исследованиям, фагоцитоз сульфатированных декстранов *in vivo* приводит к снижению активности NO-синтазы [5]. Влияние декстранов на макрофагальную аргиназу не изучено.

Цель работы — изучить влияние окисленных декстранов на аргиназную и NO-синтазную активности макрофагов мышей.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали мышей самок линии (C57Bl/6×DBA/2)F<sub>1</sub> массой 20-22 г, полученных из питомника ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН в возрасте 2 мес.

В опытах *in vivo* окисленные химическим путем декстраны [3] с молекулярной массой 30-35 кД и 60-65 кД вводили интраперитонеально в дозе 50 мг/мышь в виде 10% растворов, приготовленных на основе 0.85% NaCl, за 24 и 48 ч до выделения макрофагов. В опытах *in vitro* окисленные декстраны вносили в культуральные среды и инкубировали с макрофагами в концентрациях 0.25 и 0.16 г/л.

Мышей выводили из эксперимента под эфирным наркозом дислокацией шейных позвонков.

В полость брюшины вводили 10 мл холодной культуральной среды RPMI-1640 с 1% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), через 2 мин культуральную среду, содержащую клетки перитонеального экссудата, извлекали с помощью шприца. Полученные таким образом суспензии клеток центрифугировали 10 мин при  $1.5 \times 10^3$  об/мин. Осадок ресуспендировали в полной культуральной среде, приготовленной на основе RPMI-1640 (без фенолового красного), содержащей 10% ФБС, 15 мМ HEPES, 0.3% L-глутамин. Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета по  $200 \times 10^3$  на лунку в объеме 200 мкл. Через 2 ч инкубации (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) неприлипающую фракцию удаляли двукратной отмывкой теплой средой RPMI-1640. Полученная таким образом прилипающая фракция клеток перитонеального экссудата преимущественно содержала макрофагальные клетки, определяемые по морфологическим признакам.

О продукции NO судили по содержанию нитритов (в мкМ) в супернатантах клеточных культур. Для стимуляции продукции NO к культурам макрофагов после отмывки добавляли ЛПС (*E. Coli* B5:055 10 мг/мл) и ЛПС в сочетании с  $\gamma$ -ИФН. В качестве источника ИФН использовали супернатант от смешанной культуры лимфоцитов, полученный стандартным способом и содержащий  $\gamma$ -ИФН в концентрации 1 У/мл [1]. Через 48 ч культивирования из каждой лунки отбирали по 100 мкл супернатанта и смешивали с реактивом Грисса в соотношении 1:1 в лунках 96-луночного плоскодонного планшета для иммунологических реакций. Планшеты выдерживали в темноте в течение 15 мин, после чего измеряли оптическую плотность при  $\lambda=540$  нм.

Активность аргиназы определяли по скорости образования мочевины. Макрофаги лизировали в лунках культурального планшета 0.1% раствором Тритон X-100, после чего к 50 мкл лизата добавляли 50 мкл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.4) и 10 мкл 50 мМ раствора хлорида марганца. Аргиназу активировали нагреванием на водяной бане при 57°C в течение 10 мин, после чего к пробам добавляли по 100 мкл 0.5 М раствора L-аргинина и инкубировали их в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O (1/3/7, об/об/об). Концентрацию мочевины определяли колориметрически на  $\lambda=540$  нм после добавления  $\alpha$ -изонитропропиофенона (9% спиртового раствора) и нагревания на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

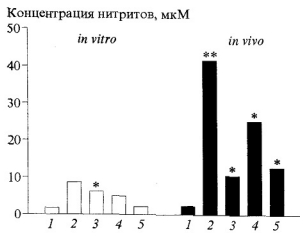
В качестве контроля при определении NO-синтазной и аргиназной активности использовали макрофаги, выделенные от интактных животных.

Статистический анализ проводили с помощью программы "Statistica 6.0" с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование макрофагов в присутствии окисленного декстрана с молекулярной массой 30-35 кД увеличивало ЛПС-стимулированную продукцию NO (при конечной концентрации декстрана 0.25 г/л) (рис. 1) и не влияло на ЛПС/ $\gamma$ -ИФН-стимулированную продукцию NO (рис. 2). Окисленный декстран с молекулярной массой 60-65 кД в условиях *in vitro* не влиял на ЛПС-стимулированную активность макрофагальной NO-синтазы и угнетал продукцию NO, стимулированную ЛПС в сочетании с  $\gamma$ -ИФН (рис. 1, 2). Вместе с тем введение окисленных декстранов интактным животным за 24 и 48 ч до выделения клеток приводило к существенному увеличению ЛПС-стимулированной продукции NO и продукции NO, стимулированной ЛПС в сочетании с  $\gamma$ -ИФН (рис. 1, 2) вне зависимости от молекулярной массы вводимых декстранов.

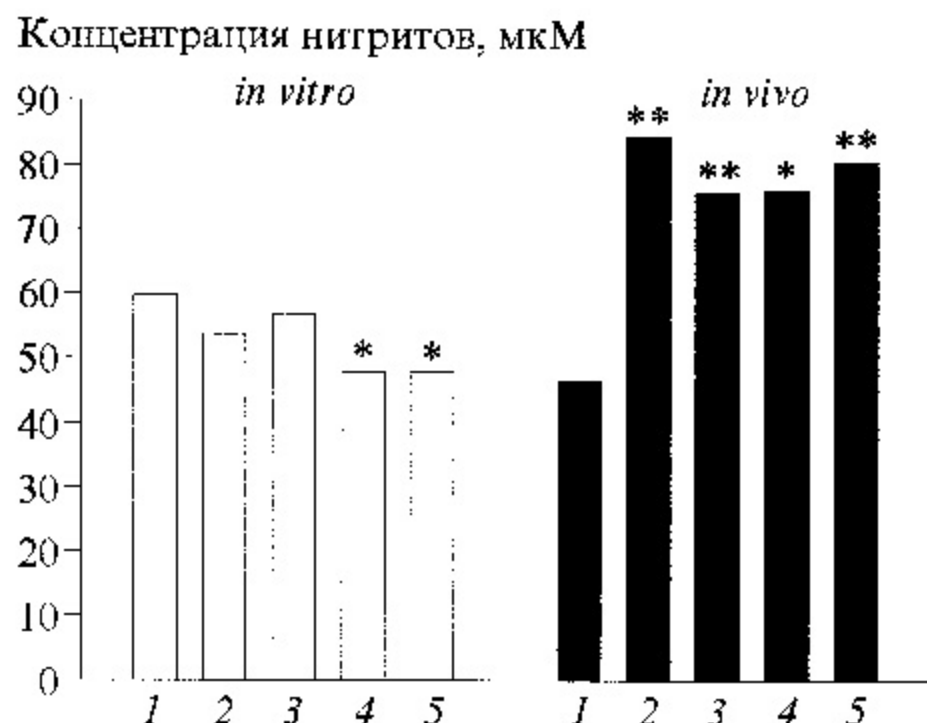
Таким образом, эффекты окислительно-модифицированных декстранов *in vivo* и *in vitro* на NO-синтазную систему макрофагов в значительной мере различаются. Это может свидетельствовать о важной роли процессов межклеточной кооперации для реализации процесса опосредованной модифицированными декстранами акти-



**Рис. 1.** Влияние окисленных декстранов на ЛПС-стимулированную продукцию NO макрофагами. Здесь и на рис. 2, 3:

*in vitro*: 1 — контроль; 2 — декстран 30 кД, 0.16 г/л; 3 — декстран 30 кД, 0.25 г/л; 4 — декстран 60 кД, 0.16 г/л; 5 — декстран 60 кД, 0.25 г/л.  
*in vivo*: 1 — контроль; 2 — декстран 30 кД, 24 ч; 3 — декстран 30 кД, 48 ч; 4 — декстран 60 кД, 24 ч; 5 — декстран 60 кД, 48 ч.

\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем.



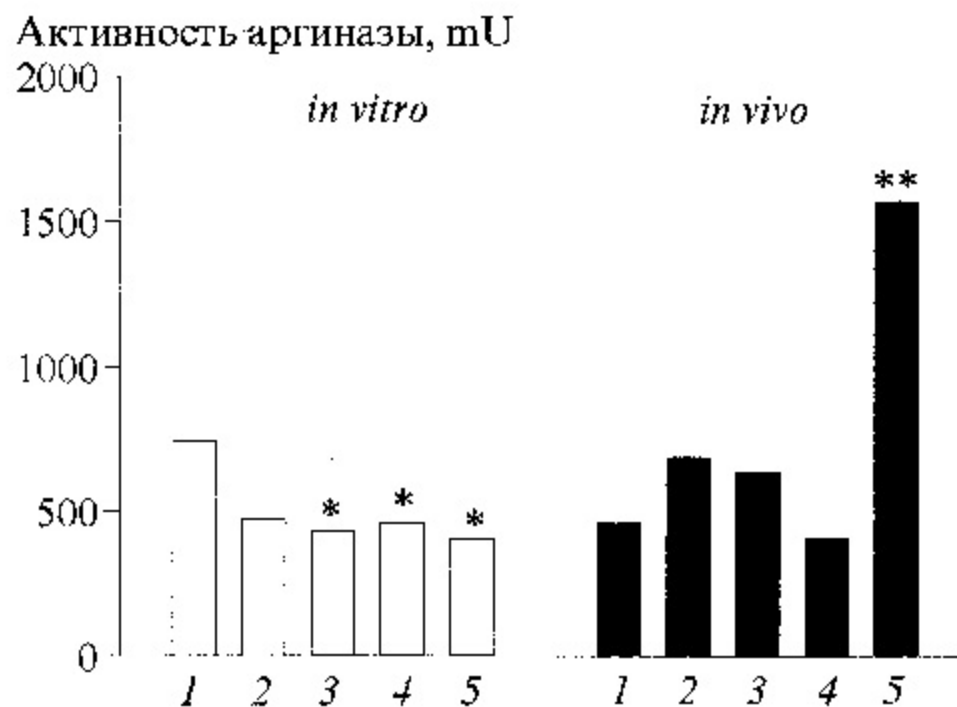
**Рис. 2.** Влияние окисленных декстранов на ЛПС/ $\gamma$ -ИФН-стимулированную продукцию NO макрофагами.

вазии синтеза NO, в которой основным “партнером” макрофагов могут являться Т-лимфоциты, синтезирующие цитокины провоспалительного профиля [8]. Наблюдаемое *in vitro* снижение ЛПС/ $\gamma$ -ИФН-стимулированной продукции NO под влиянием окисленных декстранов может быть объяснено активацией в макрофагах супероксид-продуцирующей системы, которая является одним из наиболее важных физиологических регуляторов продукции NO [10].

Введение животным за 48 ч до выделения макрофагов модифицированного декстрана молекулярной массой 60–65 кД увеличивало активность аргиназы в клетках (рис. 3), однако менее выражено по сравнению с уровнем активации NO-синтазы. Можно предположить, что физиологическая роль наблюдаемой в данном случае стимуляции аргиназной активности состоит в предотвращении избыточной продукции NO, в высоких концентрациях способного оказывать неблагоприятные эффекты на клетки.

Окисленные декстраны в условиях *in vitro* угнетают активность макрофагальной аргиназы (рис. 3), что создает предпосылки для активации NO-синтазной системы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что окисленные декстраны разной молекулярной массы оказывают существенное влияние на баланс между NO-синтазой и аргиназой в макрофагах. При этом преобладание NO-синтазной активности способствует “поляризации” макрофагов в сторону M-1, продуцирующих провоспалительные цитокины и стимулирующих клеточно-опосредованные иммунные реакции. Описанные эффекты окисленных декстранов на метаболизм аргинина в макрофагах позволяют предположить перспективность



**Рис. 3.** Влияние окисленных декстранов на активность макрофагальной аргиназы. За mU активности аргиназы принимали количество фермента, синтезирующего 1 ммоль мочевины в минуту.

использования исследуемых веществ в качестве биосовместимых матриц-носителей биологически активных веществ, в том числе лекарственных препаратов с антибактериальными и антигрибковыми свойствами для их адресной доставки и модуляции функций макрофагов и клеток СМФ в целом.

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2012 гг.”, государственный контракт № 02.513.11.3183.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Методы исследования в иммунологии* / Под ред. И.Левковитса, Б.Перниса. М., 1981.
2. Шкурин В.А., Курунов Ю.Н., Яковченко Н.Н. Лизосомотропизм — проблемы клеточной физиологии и медицины. Новосибирск, 1999.
3. Шкурин В.А., Архипов С.А., Троицкий А.В. и др. // Бюл. exper. биол. 2008. Приложение 1. С. 120–123.
4. Kriegelstein C.F., Cezwinka W.H., Lazoux F.S. et al. // J. Exp. Med. 2001. Vol. 194, N 9. P. 1207–1218.
5. Michael S.L., Pumford N.R., Mayeux P.R. et al. // Hepatology. 1999. Vol. 30, N 1. P. 186–195.
6. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M. et al. // J. Immunol. 2000. Vol. 164, N 12. P. 6166–6173.
7. Mills C.D. // Ibid. 1991. Vol. 146, N 8. P. 2719–2723.
8. Munder M., Eichmann K., Modolell M. // Ibid. 1998. Vol. 160, N 11. P. 5347–5354.
9. Obermeier F., Kojouharoff G., Hans W. et al. // Clin. Exp. Immunol. 1999. Vol. 116, N 2. P. 238–245.
10. Squadrito G.L., Pryor W.A. // Free Radic. Biol. Med. 1998. Vol. 25, N 4–5. P. 392–403.
11. Tsuji M., Dimov V.B., Yoshida T. // Am. J. Pathol. 1995. Vol. 147, N 4. P. 1001–1015.