

**И. П. Жураковский, М. В. Битхаева, С. А. Архипов, Т. А. Кунц
М. Г. Пустоветова, И. О. Маринкин**

Новосибирский государственный медицинский университет
Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия
E-mail: murash2003@yandex.ru

ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ПЕРСИСТЕНЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Для выявления особенностей активации системы мононуклеарных фагоцитов печени проведена оценка экспрессии маркера макрофагов / моноцитов (клон IC7 – аналог CD68), маркера активации клеток (CD25), белков регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bad) в синусоидных клетках печени, а также уровня цитокинов (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF γ , TGF β) в сыворотке крови 18 самцов крыс Wistar, при воспроизведении у 12 из них фокальной персистирующей инфекции с помощью культуры золотистого стафилококка (штамм 209). Полученные данные свидетельствуют о неоднозначной направленности реакции иммунной системы в условиях персистенции бактериальной инфекции: происходит динамическая балансировка между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами. Активация системы мононуклеарных фагоцитов печени происходит на фоне усиления процессов инициации апоптоза эндотелиоцитов и зависит от состояния «цитокиновой сети», в которой часто меняющиеся сигналы носят сложный характер из-за большого разнообразия цитокиновых рецепторов и из-за того, что каждый цитокин может активировать или подавлять несколько процессов, включая свой собственный синтез и синтез других цитокинов.

Ключевые слова: система мононуклеарных фагоцитов, клетки Купфера, бактериальная инфекция, цитокины, апоптоз.

Современные условия техногенной цивилизации способствуют широкому распространению воспалительных заболеваний. Многие исследователи связывают высокую частоту хронических заболеваний различных органов и систем с воздействием неблагоприятных экологических факторов, несвоевременным и неадекватным лечением острых инфекционно-воспалительных процессов, развивающихся на фоне несовершенного иммунного ответа на этиологический фактор [1; 2]. Длительное существование фокальной персистирующей инфекции вызывает определенное изменение функционирования основных гомеостатических систем и, как следствие, структурную перестройку органов и тканей.

Система мононуклеарных фагоцитов в печени представлена клетками Купфера, которые составляют примерно 10 % от общей численности клеточных элементов в этом органе [3] и образуют 80–90 % всех

тканевых макрофагов в организме [4]. Имеются работы, в которых обращается внимание на роль, которую играют мононуклеарные фагоциты при патологии печени. При этом отмечается, что активированные клетки Купфера запускают целый ряд процессов: осуществляют взаимодействие с гепатоцитами и другими клетками печени, секретируя различные биологически активные медиаторы, в том числе цитокины, хемокины, эйкозаноиды, протеолитические ферменты, активные формы кислорода и оксид азота; привлечение и удерживание нерезидентных клеток в печень, таких как нейтрофилы, Т-лимфоциты, НК клетки, моноциты; осуществляют функцию фагоцитоза, способствуя индукции активации и регуляции иммунитета к различным инфекционным агентам [5–7]. Вместе с тем взаимосвязи между макрофагальной системой печени и изменениями цитокинового профиля при персистенции бактериальной ин-

фекции вне печени остаются еще не изученными.

Цель исследования – выявить зависимость экспрессии маркера макрофагов / моноцитов и маркера активации клеток в печени крыс Wistar от уровня цитокинов в сыворотке крови при персистенции бактериальной инфекции.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 18 половозрелых крысах-самцах Wistar с исходной массой 180–220 г. В качестве контроля использовали 6 интактных животных (1-я группа). У 12 животных с помощью культуры золотистого стафилококка (штамм 209) воспроизведен остеомиелит большеберцовой кости. Животных выводили из эксперимента через 2 и 3 мес. с момента воспроизведения модели (2-я и 3-я группа соответственно). Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Материал (печень) фиксировали в 12 % формалине. Из залитых в парафин объектов делали серийные срезы толщиной 7 мкм, которые для обзорной световой микроскопии окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином. Для изучения экспрессии в синусоидных клетках печени белков, принимающих участие в механизмах инициации и пролонгировании апоптотического процесса в клетках (Vcl-2 и Vad), использовали двухэтапный иммуногистохимический метод. Для оценки пула всех клеток системы мононуклеарных фагоцитов в печени, в том числе моноцитов, применяли моноклональные антимacroфагальные антитела к антигену, который экспрессируется на мембранах большинства моноцитов / макрофагов (клон 1С7 – аналог кластера дифференцировки CD68). Для выявления пула иммунокомпетентных активированных клеток использовали антитела к кластеру дифференцировки CD25. Анализ интенсивности специфического окрашивания и площади, на которой они выявлялись, проводился с помощью светооптического микроскопа и морфометрического комплекса на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13с («Baumer», США) и программного обеспе-

чения ImageJ 1.42g (США). Для каждой группы оценивалось по 48 изображений, площадь каждого составляла 21 455 мкм².

Исследование цитокинового профиля проводилось наборами реагентов для иммуноферментного определения концентрации (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ , TGF β) в сыворотке крови (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) с использованием Wellwasf 4 Mk2 и спектрофотометра Multiscan Spectrum («Thermo scientific», Финляндия).

Статистическая обработка полученных в ходе исследования данных проводилась с использованием программного пакета для статистической обработки SPSS 13.0. Учитывая малое количество случаев в выборке, применялись непараметрические критерии. Сравнение независимых групп проводили с использованием критерия Крускала – Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна – Уитни. Отличия между значениями сравниваемых параметров расценивались как статистически значимые при достижении уровня статистической значимости $p < 0,05$. С целью выявления наиболее информативного комплекса признаков осуществлялся корреляционный анализ путем вычисления коэффициента корреляции с помощью непараметрического критерия Спирмена.

Результаты исследования и обсуждение

Установлено, что персистенция бактериальной инфекции в большеберцовой кости сопровождается развитием признаков неспецифического реактивного гепатита, который сохранял свою активность на протяжении всего эксперимента. Проведенное на этом фоне изучение экспрессии белков-регуляторов апоптоза позволило выявить определенную динамику изменений, касающихся экспрессии белков семейства Vcl-2, от соотношения которых зависит вероятность индукции апоптоза. При этом отмечены следующие изменения относительной площади синусоидных клеток, экспрессирующих проапоптотический маркер Vad: в 1-й группе – $16,5 \pm 0,6$, во 2-й – $25,0 \pm 1,5$ ($p < 0,05$), в 3-й группе – $18,5 \pm 0,4$ % ($p > 0,05$). В то время относительная площадь аналогичных клеточных элементов, экспрессирующих антиапопто-

тический белок Vcl-2, изменялась следующим образом: в 1-й группе – $18,5 \pm 0,7$, во 2-й – $24,3 \pm 1,0$ ($p < 0,05$), в 3-й группе – $12,9 \pm 0,4$ % ($p < 0,05$). Фактор Vcl-2 поддерживает инактивированное состояние проапоптотического белкового комплекса, в то время как белок Bad относят к группе апоптоз-опосредующих факторов, наряду с Вах, Вак, Вик, Вид. Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Vcl-2, которое нейтрализует ингибирующее действие последнего, что и было установлено.

При оценке экспрессии маркера, который определяется на мембранах большинства моноцитов / макрофагов (клон 1С7), через 2 мес. после воспроизведения очага хронической инфекции выявлено достоверное увеличение объема пула мононуклеарных фагоцитов в печени (табл. 1). Вместе с тем интенсивность специфического окрашивания не отличалась от контрольной группы. При анализе площади, на которой выявлялись клеточные элементы, экспрессирующие маркер активации CD25, отмечено ее увеличение в 1,5 раза по сравнению с интактными животными. Кроме того, показатель интенсивности специфического окрашивания также стал выше. Обращало на себя внимание значительное изменение от-

ношения общего количества макрофагов к активированным формам клеточных элементов. Это демонстрирует, что персистенции бактериальной инфекции приводит к достоверному увеличению пула активированных мононуклеарных клеток в печени.

Изучение профиля цитокинов позволило выявить статистически значимое повышение провоспалительных (IL-1 β , IL-6, IL-17, INF- γ) и противовоспалительных (IL-1 β RA, IL-10) компонентов иммунной защиты (табл. 2). При поведении корреляционного анализа получены результаты, указывающие на существование высоко значимых зависимостей:

а) отрицательной зависимости – между относительной площадью, занимаемой клеточными элементами, экспрессирующими клон 1С7, и концентрацией IL-1 β RA в сыворотке крови ($r = -0,886$; $p = 0,019$);

б) положительной зависимости – между площадью, занимаемой клеточными элементами, экспрессирующими клон 1С7, и концентрацией IL-6 в сыворотке крови животных этой группы ($r = 0,886$; $p = 0,019$);

в) отрицательной зависимости – между площадью, занимаемой клеточными элементами, экспрессирующими маркер активации CD25, и концентрацией IL-4 ($r = -0,943$; $p = 0,005$).

Таблица 1

Относительная площадь (%) и интенсивность специфического окрашивания (усл. ед.) клеточных элементов, экспрессирующих маркеры 1С7 (аналог CD68) и CD25 ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных		
	1-я ($n = 6$)	2-я ($n = 6$)	3-я ($n = 6$)
Относительная площадь моноцитов / макрофагов, экспрессирующих маркер 1С7	$12,6 \pm 0,5$	$17,6 \pm 0,5$ *	$15,2 \pm 0,3$ *
Относительная площадь активированных клеточных элементов, экспрессирующих маркер CD25	$9,1 \pm 0,3$	$18,5 \pm 0,7$ *	$15,9 \pm 0,4$ *
Интенсивность окрашивания моноцитов / макрофагов, экспрессирующих маркер 1С7	$32,7 \pm 0,8$	$33,7 \pm 1,0$	$30,0 \pm 0,8$
Интенсивность окрашивания активированных клеточных элементов, экспрессирующих маркер CD25	$27,7 \pm 0,7$	$38,3 \pm 0,9$ *	$29,8 \pm 0,9$
Отношение относительной площади клеточных элементов, экспрессирующих маркер 1С7 к относительной площади клеточных элементов, экспрессирующих маркер CD25	$1,4 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$ *	$1,0 \pm 0,0$ *

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению с 1-й группой при $p < 0,05$.

Таблица 2
Концентрация цитокинов в сыворотке крови, пг/мл ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных		
	1-я ($n = 6$)	2-я ($n = 6$)	3-я ($n = 6$)
IL-1 β	3,9 \pm 0,8	5,3 \pm 0,4 *	3,9 \pm 0,4
IL-1 β RA	110,3 \pm 19,1	179,1 \pm 24,4 *	192,1 \pm 72,6 *
IL-2	19,7 \pm 7,5	17,1 \pm 1,7	16,5 \pm 2,9
IL-4	3,2 \pm 0,1	4,1 \pm 0,8 *	3,7 \pm 0,5 *
IL-6	5,0 \pm 0,3	6,1 \pm 0,6 *	5,6 \pm 0,7
IL-10	23,6 \pm 1,6	28,7 \pm 4,2	26,9 \pm 3,2 *
IL-17	16,5 \pm 1,0	21,4 \pm 2,7 *	19,5 \pm 2,4 *
IL-18	19,8 \pm 0,9	20,9 \pm 2,2	21,3 \pm 1,2 *
IFN γ	17,5 \pm 2,0	32,3 \pm 3,9 *	21,6 \pm 3,1 *
TGF β	28,8 \pm 1,1	24,1 \pm 0,7 *	22,3 \pm 0,4 *
TNF α	5,8 \pm 0,2	5,8 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1

Примечание: * – отличия достоверны по сравнению с 1-й группой при $p < 0,05$.

При оценке через 3 мес. после воспроизведения очага хронической инфекции, который экспрессируется на мембранах большинства моноцитов / макрофагов (клон 1С7), установлено сохраняющееся статистически значимое увеличение объема пула мононуклеарных фагоцитов в печени. Интенсивность специфического окрашивания достоверно не отличалась от показателя интактных животных. Аналогичные данные получены при анализе экспрессии антител к маркеру активации CD25. Примечательно, что соотношение общего числа мононуклеарных фагоцитов к активированным формам клеточных элементов было с некоторым превалированием последних. Это, по всей видимости, являлось отражением не только увеличения количества активированных клеток Купфера, но и определенного количества активированных лимфоидных элементов.

Изучение профиля цитокинов позволило также выявить статистически значимое повышение провоспалительных (IL-17, IL-18, INF- γ) и противовоспалительных (IL-1 β RA, IL-10) компонентов иммунной защиты. При проведении корреляционного анализа получены результаты, указывающие на существование высоко значимой положительной зависимости между концентрацией IL-18 и площадью, занимаемой клеточными эле-

ментами, экспрессирующими клон 1С7 ($r = 0,941$; $p = 0,005$).

Персистенция бактериальной инфекции, сопровождающаяся микроциркуляторными нарушениями, спровоцировала активацию механизма, запускающего апоптозный процесс в эндотелиальных клетках. Отмечается, что в норме эти клеточные элементы активно секретируют TGF β и IL-10 [8]. Несмотря на то, что эти биологически активные вещества относятся к противовоспалительным цитокинам, точки их приложения разные: IL-10 блокирует секрецию IFN γ -стимулирующих цитокинов, воздействуя непосредственно на макрофаги, в то время как TGF β воздействуют на Т-лимфоциты и NK-клетки, снижая секрецию ими IFN γ [9]. Снижение TGF β при отсутствии повышения IL-10 в 1-й группе может сопровождаться уменьшением их ингибирующего воздействия на Т-лимфоциты и NK-клетки, что объясняет наблюдаемое повышение уровня IFN- γ .

Выявленное увеличение количества макрофагов / моноцитов в печени, а также возрастание пула активированных клеточных элементов подтверждает возможность запуска при персистенции бактериальной инфекции классического пути активации купферовских клеток, продуцируемых Th1-лимфоцитами и NK-клетками IFN- γ , IL-12, IL-18. Учитывая наблюдаемое в экспери-

менте увеличение уровня IL-4, нельзя полностью исключить возможность и альтернативного пути активации макрофагов, осуществляемого через Th2.

Принимая во внимание, что клетки Купфера играют центральную роль в регуляции цитокинов печени при инфекции [10], а также служат значительным источником системного IL-6, IL-1 и IL-10 [11], можно предположить, что при персистенции бактериальной инфекции именно активация мононуклеарных фагоцитов печени объясняет выявленное повышение указанных интерлейкинов.

Необходимо также учесть, что ответ клеток Купфера на стресс считается двухфазным: первоначально наблюдается преобладание секреции провоспалительных факторов, таких как TNF α , IL-6 и IL-1, с последующей вторичной секрецией противовоспалительных медиаторов, таких как IL-10 [12]. Данная тенденция подтверждается и результатами настоящего исследования. Так, через 2 мес. после воспроизведения бактериальной инфекции еще сохранялся повышенный уровень IL-6 и IL-1 β , хотя уже не только не отмечено увеличения TNF α , но и наблюдалось существенное возрастание IL-1 β RA. В последующем, через 3 мес. после создания очага бактериальной инфекции, уровень IL-6 и IL-1 β в сыворотке крови достоверно не отличался от аналогичных показателей интактных животных, вместе с тем наблюдалось статистически значимое увеличение IL-10 и IL-1 β RA.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о неоднозначной направленности реакции иммунной системы в условиях персистенции бактериальной инфекции: происходила динамическая балансировка между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, осуществляющими взаимодействие с системой мононуклеарных фагоцитов печени. Процесс активации купферовских клеток, ведущий через активацию звездчатых клеток печени к развитию фиброза, зависит от уровня «цитокиновой среды», в которой часто меняющиеся сигналы носят сложный характер из-за большого разнообразия цитокиновых рецепторов и того, что каждый цитокин может активировать или подавлять несколько процессов,

включая свой собственный синтез и продукцию других цитокинов.

Список литературы

1. Карпин В. А. Общая теория патологии: хронический инфекционный процесс // Усп. современного естествознания. 2005. № 4. С. 17–20.
2. Пекарева Н. А., Трунова Л. А., Белюсова Т. В., Горбенко О. М., Шваюк А. П., Трунов А. Н. К вопросу об активности иммуновоспалительного процесса у детей с хроническим пиелонефритом в стадии клинической ремиссии // Бюл. СО РАМН. 2008. № 3. С. 52–55.
3. Wake K., Decker K., Kirn A., Knook D. L., McCuskey R. S., Bouwens L., Wisse E. Cell Biology and Kinetics of Kupffer Cells in the Liver // Int. Rev. Cytol. 1989. Vol. 118. P. 173–229.
4. Bouwens L., Baekeland M., Zanger R. de, Wisse E. Quantitation, Tissue Distribution and Proliferation Kinetics of Kupffer Cells in Normal Rat Liver // Hepatology. 1986. Vol. 6, № 4. P. 718–722.
5. Racanelli V., Rehermann B. The Liver as an Immunological Organ // Hepatology. 2006. Vol. 43. P. 54–62.
6. Gao B., Jeong W. I., Tian Z. Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity // Hepatology. 2008. Vol. 47. P. 729–736.
7. Maher J. J., Leon P., Ryan J. C. Beyond Insulin Resistance: Innate Immunity in Nonalcoholic Steatohepatitis // Hepatology. 2008. Vol. 48. P. 670–678.
8. Jacques A., Bleau C., Martin J.-P., Lamontagne L. Intrahepatic Endothelial and Kupffer Cells Involved in Immunosuppressive Cytokines and Natural Killer (NK) / NK T cell disorders in viral acute hepatitis // Clin. Exp. Immunol. 2008. Vol. 152, № 2. P. 298–310.
9. Schroder M., Meisel C., Buhl K., Profanter N., Sievert N., Volk H.-D., Grutz G. Different Modes of IL-10 and TGF- β to Inhibit Cytokine-Dependent IFN- γ Production: Consequences for Reversal of Lipopolysaccharide Desensitization // J. Immunol. 2003. Vol. 170, № 10. P. 5260–5267.
10. Knolle P. A., Gerken G. Local Control of the Immune Response in the Liver // Immunol. Rev. 2000. Vol. 174. P. 21–34.
11. Decker K. Biologically Active Products of Stimulated Liver Macrophages (Kupffer

cells) // Eur. J. Biochem. 1990. Vol. 192. P. 245–261.

12. Farmer D., Amersi F., Kupiec-Weglinski J. W., Busuttill R. W. Current Status of

Ischemia and Reperfusion Injury in the Liver // Transplant. Rev. 2000. Vol. 14. P. 106–126.

Материал поступил в редколлегию 13.06.2012

**I. P. Zhurakovskij, M. V. Bitkhaeva, S. A. Arkhypov, T. A. Kunts
M. G. Pustovetova, I. O. Marinkin**

**LIVER MACROPHAGES ACTIVATION FEATURES
AT PERSISTING BACTERIAL INFECTION**

The experiment was carried out in 18 male rats, 12 of them undergone focal persisting infection by means of *Staphylococcus aureus* (strain 209). Expression of macrophage/monocyte marker (clone IC7 – CD68 prototype), cell activation marker (CD25), apoptosis regulatory proteins (Bcl-2, Bad) in sinusoidal liver cells and cytokines (IL-1 β , IL-1 β RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ) level in blood serum was estimated to reveal the activation of the mononuclear phagocytes system features in the liver. Findings suggest multichoice reactions of the immune system at persisting bacterial infection that could be balancing between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. Activation of liver mononuclear phagocytes system occurs under intensification of endotheliocytes apoptosis initiation and depends on cytokine network. Frequently varying signals of this network are complicated due to manifold cytokine receptors each of them can activate or suppress several processes including its own and other cytokines synthesis.

Keywords: mononuclear phagocytes system, Kupffer cells, bacterial infection, cytokines, apoptosis.