

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ МАКРОФАГОВ НА РАЗВИТИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕПРЕССИИ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ *in vivo*

М. А. Дергунова, Т. А. Короленко, С. Я. Жанаева, Т. В. Алексеенко¹

Однократное введение хлористого гадолиния (7,5 мг/кг внутривенно) мышам является моделью селективной депрессии макрофагов печени *in vivo*. Исследовали влияние стимуляции макрофагов на динамику накопления гадолиния клетками печени. Концентрацию гадолиния в ткани печени определяли методом эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Предварительное однократное (за 24 ч) введение животным стимуляторов макрофагов — зимозана (50 мг/кг) и карбоксиметилированного хитин-гликана (25 мг/кг) повышало скорость захвата гадолиния клетками печени. Одновременно обнаружено восстановление сниженной при депрессии макрофагов печени активности хитотриозидазы сыворотки крови (фермента макрофагов).

Ключевые слова: стимуляторы макрофагов печени, хлористый гадолиний, хитотриозидаза, лизосомы

ВВЕДЕНИЕ

Гадолиний (Gd) трехвалентный химически активный лантаноид (редкоземельный элемент), имеет важное значение в современных медицинских технологиях, прежде всего при проведении магнитно-резонансной томографии с использованием контрастных материалов [12, 13]. Перспективно использование соединений Gd (хелатов) при нейтронно-захватывающей терапии (neutron capture therapy). При этом соединения Gd включают в наноструктурные материалы, что позволяет повышать концентрацию элемента в исследуемых тканях (опухолях) [11]. Синтезируются новые соединения, содержащие Gd, которые эффективны в клинических испытаниях при использовании в качестве монотерапии или в комбинации с химио- и радиотерапией опухолей легкого с метастазами в мозг [8]. Изучаются возможности использования соединений Gd в трансплантологии [7, 14], в диагностике и лечении опухолей [1], а также лечении токсического гепатита [3], эндотоксемии [15].

Соединения Gd используются в экспериментальной биологии и медицине для селективного подавления скорости рецепторного эндоцитоза, индукции апоптоза крупных макрофагов печени [8, 15]. Введение хлористого гадолиния (ХГ) животным подавляет экспрессию β -2 интегринов, молекул адгезии, ФНО- α [6], снижает продукцию супероксида кислорода [9]. Ряд соединений, вызывающих депрессию макрофагов печени (метилпальмитат), оказывают гепатопротекторное действие на модели повреждения печени, вызванного галактозамином [2].

Изучается селективность воздействия Gd на различные пулы макрофагов [2, 8]. Показано, что с увеличением дозы ХГ в печени развиваются некрозы, связан-

ные с повышенной секрецией ТНФ- α , что является пусковым механизмом в развитии каскада клеточных событий, сопровождающихся апоптозом макрофагов и их репопуляцией. Данный эффект носит дозо- и временно-зависимый характер, что создает возможность фармакологического воздействия на функциональную активность макрофагов [10]. Остаются неясными механизмы возможной стимуляции макрофагов при развитии депрессии макрофагов.

Цель исследования: изучить динамику накопления Gd в клетках печени при предварительном введении мышам стимуляторов макрофагов и исследовать изменения активности хитотриозидазы сыворотки крови, имеющей преимущественно макрофагальное происхождение.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали взрослых самцов мышей линии СВА, массой 20 – 25 г (виварий Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). ХГ (предоставлен М. Хардонком, Голландия) вводили мышам однократно внутривенно в хвостовую вену под легким эфирным наркозом в дозе 7,5 мг/кг [4, 5], зимозан — за 24 ч до введения ХГ однократно, в дозе 50 мг/кг внутривентально, карбоксиметилированный β -1,3-гликан (КМГ) и хитокарбоксиметилгликан (ХитоКМГ) (препараты производства Института химии Словацкой АН, Братислава) — 25 мг/кг внутривентально. Контрольным животным вводили внутривенно соответствующий объем физиологического раствора. Забой животных производили в динамике через 5, 30, 60 мин и спустя 1 сутки после введения ХГ. Сыворотку крови получали при центрифугировании образцов при 3000 g в течение 15 мин при 4° С (центрифуга Eppendorf 5415R, Германия).

Концентрацию Gd в печени оценивали методом атомной эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ОАО “Катализатор”, Новоси-

¹ Лаборатория клеточной биохимии (руководитель — проф. Т. А. Короленко) Учреждение РАМН НИИ физиологии СО РАМН, 630117, Новосибирск-117, Тимакова, 4.

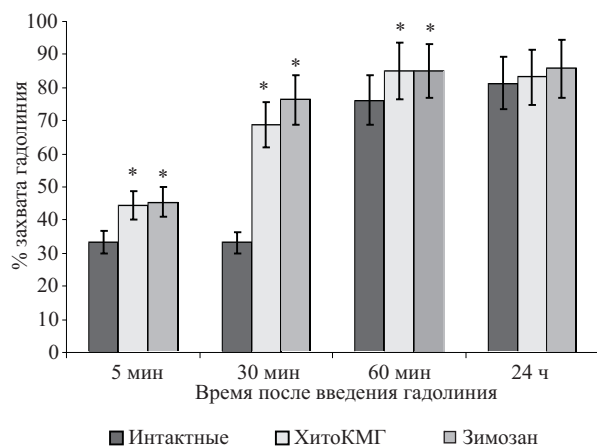


Рис. 1. Влияние зимозана и ХитоКМГ на захват Gd клетками печени мышей (в процентах от введенной дозы).

По оси ординат — концентрация гадолиния, %. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс — время после введения ХГ (7,5 мг/кг массы). В каждой группе с введением соединений — 15 животных.

У интактных мышей, не получивших ХГ (число животных — 20), Gd в ткани печени не обнаружен.

* $p < 0,01$ по сравнению с интактными животными с введением ХГ в соответствующий период времени.

бирск) [1]. Пробы печени предварительно подвергали сухому, а затем мокрому озолению в смеси хлористоводородной и азотной кислот. Работу проводили на спектрометре Л-70 (“Jobel Ivon”, Франция). В качестве аналитической линии Gd использовали линию GdII 342, 247 нм. Предел обнаружения Gd установлен по критерию 2 сигмы, фон 0,005 мкг/см³ в интервале концентраций от 0,01 до 10 мкг/см³. Величина относительного стандартного отклонения не превышала 0,005.

Активность хитотриозидазы сыворотки крови определяли флуоресцентным методом с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил(МУФ)- β -D-N,N',N''-триацетилхитотриозид (“Сигма”, США)

Влияние предварительного введения β -1,3-гликанов на активность хитотриозидазы в сыворотке крови мышей с селективной депрессией макрофагов печени

Группа животных	Активность хитотриозидазы, нмоль МУФ/мл в час
1. Контроль (интактные)	282,9 ± 23,72
2. ХГ, 2 сут	121,5 ± 12,20*
3. ХГ, 4 сут	290,8 ± 13,72
4. КМГ, 2 сут	738,7 ± 67,70*
5. Хито-КМГ, 2 сут	479,0 ± 30,70*
6. ХитоКМГ + ХГ, 2 сут	390,9 ± 13,72* $p_{2-6} < 0,01$
7. КМГ + ХГ, 2 сут	384,7 ± 18,42* $p_{2-7} < 0,01$
8. КМГ + ХГ, 7 сут	296,0 ± 28,86 $p_{2-8} < 0,05$

Примечание. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем. В каждой группе — 15 животных. МУФ — метилумбеллиферон.

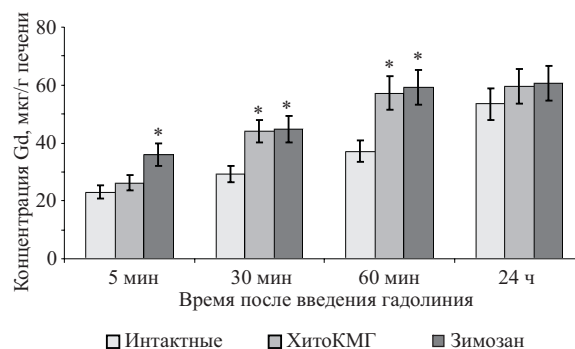


Рис. 2. Влияние зимозана (50 мг/кг внутривенно) и ХитоКМГ (25 мг/кг внутривенно) на концентрацию Gd в печени мышей, мкг/г.

По оси ординат — захват печенью Gd, мкг/г. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

[1, 6]. Флуоресценцию оценивали с помощью спектрофлуориметра Перкин-Эльмер 650 – 10S (США) при 360 (возбуждение) и 455 (эмиссия) нм. Данные обрабатывали статистически методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами ранее показано, что после однократного введения ХГ интактным мышам и крысам Gd быстро захватывается из циркуляции, достигая максимальной концентрации в печени через 1 ч – 1 сут [1]. В настоящей работе обнаружено, что введение стимуляторов макрофагов зимозана и ХитоКМГ (за 24 ч до ХГ) мышам ускоряет процесс захвата Gd клетками печени, увеличивая концентрацию Gd в ткани печени, как абсолютную (рассчитанную в мкг Gd в расчете на грамм ткани печени), так и относительную (процент захвата Gd, рассчитанный от введенной дозы ХГ) (рис. 1, 2). Наиболее существенное усиление скорости захвата Gd при воздействии зимозана и ХитоКМГ отмечено спустя 30 и 60 мин после введения ХГ (рис. 1, 2). Через 24 ч, когда происходит максимальный захват Gd, у животных, получивших и не получивших стимуляторы макрофагов, различий содержания Gd не отмечено (рис. 1, 2).

Обнаружено повышение активности хитотриозидазы сыворотки крови при воздействии как ХитоКМГ, так и КМГ, что свидетельствует о способности этих β -1,3-D-гликанов стимулировать макрофаги печени (таблица). В то же время, напротив, при введении ХГ спустя 2 суток происходит снижение активности хитотриозидазы (таблица), отражающее подавление функциональной активности макрофагов печени. Предварительное введение стимуляторов макрофагов предотвращало снижение активности хитотриозидазы, вызванное воздействием ХГ. В последующем (через 7 сут) активность хитотриозидазы в группе с введени-

ем КМГ + Gd не отличалась от показателей интактных животных (таблица). Таким образом, предварительное введение мышам исследованных β -1,3-гликанов предотвращало депрессию макрофагов печени при воздействии ХГ. Механизм защиты, очевидно, связан с увеличением числа и функциональной активности макрофагов печени, которые происходят до развития депрессии макрофагов, вызываемой ХГ, так что число макрофагов печени существенно не снижается (вероятно, как и их эндоцитозная активность) [2, 6]. Защитное действие β -1,3-гликанов не отмечено нами в экспериментах, если использовали последующее (после ХГ) введение мышам КМГ и ХитоКМГ [1, 2]. Очевидно, репопуляция макрофагов печени при воздействии β -1,3-гликанов на модели депрессии макрофагов печени имеет особенности, которые требуют дальнейшего исследования. Данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что модель селективной депрессии макрофагов печени, вызываемая с помощью ХГ, может быть использована для оценки эффективности ряда стимуляторов макрофагов, особенно новых модификаторов биологического ответа полисахаридной природы. Можно предположить, что при проведении магнитно-резонансной томографии опухолей с помощью хелатов Gd повышенный захват Gd осуществляется макрофагами, ассоциированными с опухолью и обладающими провоспалительной активностью.

ВЫВОДЫ

1. Предварительное введение зимозана и хитокарбоксиметилгликана (за 24 ч) мышам ускоряет процесс захвата Gd (гадолиний) клетками печени, увеличивая концентрацию Gd в ткани печени.

2. При воздействии β -1,3-гликанов обнаружено восстановление активности хитотриозидазы сыворотки

крови, сниженной при депрессии макрофагов печени, вызываемой хлористым гадолинием.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Я. Жанаева, Т. А. Короленко, Б. Г. Некрасов и др., *Бюл. экспер. биол. мед.*, **140**(10), 450 – 452 (2005).
2. М. А. Dergunova, T. V. Aleexeenko, S. Y. Zhanaeva, et al., *International Immunopharmacology*, **9**(6), 729 – 733 (2009).
3. H. Ding, R. Peng, E. Reed, Q. Li, *Int. J. Molec. Med.*, **12**(4), 549 – 557 (2003).
4. G. Farkas, Z. Szasz, G. Lazar, et al., *Transplant. Proc.*, **34**(5), 1460 – 1461 (2002).
5. M. J. Hardonk, F. W. J. Dijkhuis, A. M. Joker, et al., *Cells of the Hepatic Sinusoid. Kupffer Cell Foundation*, Eds. E. Wisse, et al., **5**, 29 – 32 (1995).
6. Т. А. Короленко, С. Джанаева, О. В. Фаламеева, et al., *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **26**(5/6), 279 – 283 (2000).
7. N. Krohn, S. Kapoor, Y. Enami, et al., *Gastroenterology*, **136**(5), 1806 – 1817 (2009).
8. D. R. Miles, M. Mesfin, T. D. Mody, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**(2), 345 – 356 (2006).
9. H. Miyakawa, R. P. Mason, J. Jiang, M. B. Kadiiska, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**(3), 241 – 249 (2009).
10. J. P. Mizgerd, R. M. Molina, R. C. Stearns, et al., *J. Leukoc. Biol.*, **59**(2), 189 – 195 (1996).
11. R. A. Roberts, P. E. Ganey, C. Ju, et al., *Toxicological Sciences*, **96**(1), 2 – 15 (2007).
12. M. A. Sieber, P. Lengsfeld, T. Frenzel, et al., *Eur. Radiol.*, **18**(10), 2164 – 2173 (2008).
13. G. J. Strijkers, W. J. M. Mulder, G. A. F. van Tilborg, K. Nikolay, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **7**, 291 – 305 (2007).
14. K. Tomiyama, A. Ikeda, S. Ueki, et al., *Hepatology*, **48**(5), 1608 – 1620 (2008).
15. S. B. Yee, B. L. Copple, P. E. Ganey, R. A. Roth, *J. Toxicol. Environ. Health A*, **65**(14), 961 – 976 (2002).

Поступила 09.06.10

EFFECT OF MACROPHAGE STIMULATORS ON DEVELOPMENT OF SELECTIVE DEPRESSION OF LIVER MACROPHAGE *in vivo*

M. A. Dergunova, T. A. Korolenko, S. Ya. Zhanaeva, and T. V. Alekseenko

Laboratory of Cell Biochemistry, Institute of Physiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. akad. Timakova 4, Novosibirsk, 630117, Russia

A single administration of zymosan (50 mg/kg) and chito-carboxymethylated glucan (25 mg/kg) to mice was shown to improve the selective liver macrophage depression induced by gadolinium chloride (7.5 mg/kg, intravenous administration). Both β -1,3-glucans (ChitoCMG and CMG) studied revealed the signs of liver macrophage stimulation: increased number and phagocytic activity of liver macrophages and increased serum chitotriosidase activity. The model of selective liver macrophage depression was characterized by decreased activity of serum chitotriosidase. ChitoCMG as well as zymosan increased the uptake of gadolinium by liver cells during preliminary (before gadolinium chloride) administration of β -1,3-glucans. It was concluded that the model of selective liver macrophage depression is useful for studying the protective effects of biological response modifiers such as polysaccharides (β -1,3-glucans) *in vivo*.

Key words: Macrophage stimulation and depression, gadolinium chloride, chitotriosidase, lysosomes, β -glucans.