

РОЛЬ P_2X_7 -РЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ ПРИ ПЕРИТОНИТЕ

Н. А. Малиновская¹, А. Б. Салмина¹, А. А. Карачева³, В. В. Салмин⁴, Ю. А. Успенская¹,
О. Л. Лопатина¹, А. Г. Соколович¹, А. В. Степаненко², О. В. Перьянова¹, Л. Д. Зыкова¹

Исследована роль P_2X_7 -рецепторов в модуляции функциональной активности макрофагов мышей при перитоните. Получены данные, свидетельствующие о возрастании функциональной активности макрофагов при перитоните, что сопровождается увеличением числа $P_2X_7^+$ макрофагов и разнонаправленным характером изменений макрофагальной активности под влиянием P_2X_7 модуляторов. Обсуждается роль P_2X_7 -ассоциированных механизмов в регуляции функциональной активности макрофагов при воспалении.

Ключевые слова: P_2X_7 -рецепторы, макрофаги, функциональная активность, АТФ, сурамин, оАТФ

ВВЕДЕНИЕ

Семейство нуклеотидных P_2 -рецепторов включает несколько подсемейств с гетерогенной структурой и функциями (P_2U , P_2X , P_2Y), которые стимулируются пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами, включая аденозинтрифосфат (АТФ) [8].

Клетки макрофагального происхождения, включая дендритные, зрелые макрофаги и микроглиальные клетки предпочтительно экспрессируют пуринергические P_2X_7 -рецепторы, которые, в зависимости от уровня активации, формируют низкопроводимый катион-селективный канал или высокопроводимую неселективную пору. Активация P_2X_7 -рецепторов требует миллимолярной концентрации внеклеточного АТФ в присутствии двухвалентных катионов. Эта концентрация соответствует реально существующей в межклеточном пространстве при ряде патологических состояний (цитоллиз, воспаление) [5, 7, 9].

Внеклеточный АТФ регулирует различные клеточные реакции во многих типах клеток, взаимодействуя с пуринергическими рецепторами. В зависимости от клеточного фона активация P_2X_7 -рецепторов вызывает разнообразные физиологические процессы, в том чис-

ле, хемотаксис, нейротрансдукцию, мышечное сокращение, агрегацию тромбоцитов, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток крови [2, 3].

P_2X_7 -рецепторы регулируют активацию макрофага в ответ на провоспалительные стимулы, их способность к образованию каналов и пор в ответ на высокие концентрации АТФ вызывает увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , вследствие чего эти рецепторы модулируют продукцию макрофагами цитокинов, активных форм кислорода и азота [4, 9].

Стимуляция P_2X_7 -рецепторов приводит к активации бактерицидных систем. Наиболее быстродействующей и эффективной является кислородзависимая бактерицидная система, включающая миелопероксидазу, каталазу, супероксиддисмутазу, НАД(Ф)Н-оксидоредуктазы. Ключевым ферментом выработки активных форм кислорода является НАД(Ф)Н-оксидаза, требующая минимальной сборки на цитоплазматической мембране для продукции супероксид-анион радикалов [6].

Цель исследования — выявить роль пуринергической системы в модуляции функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей при остром экспериментальном перитоните.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были белые беспородные мыши-самцы массой 18 – 20 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Испытуемые животные были распределены на 2 группы: контрольную ($n = 30$); экспериментальную ($n = 30$).

Экспериментальная модель перитонита выполнялась по методике М. Thakker и соавт. [10] с модификациями: инъекции производили анестезированным животным при соблюдении правил асептики, интраперитонеально вводили 1 мл суточной бульонной культуры

¹ Кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии (зав. — проф. А. Б. Салмина), кафедра патологической анатомии (зав. — проф. Л. Д. Зыкова), кафедра микробиологии (зав. — доц. О. В. Перьянова), кафедра хирургических болезней № 2 (зав. — проф. А. Г. Соколович) ГОУ ВПО КрасГМА Росздрава, Красноярск, 660022, ул. П. Железняка, 1.

² Отделение гнойной хирургии (зав. — А. В. Степаненко) КГУЗ “Краевая больница”, Красноярск, 660022, ул. П. Железняка, 3а.

³ Кафедра биологии с курсом фармакогнозии (зав. — проф. Т. Я. Орлянская) ГОУ ВПО КрасГМА Росздрава, Красноярск, 660021, ул. Карла Маркса, 124.

⁴ Кафедра квантовой электроники (зав. — проф. А. С. Проворов), Красноярск ГОУ ВПО СФУ, 660041, пр. Свободный, 79.

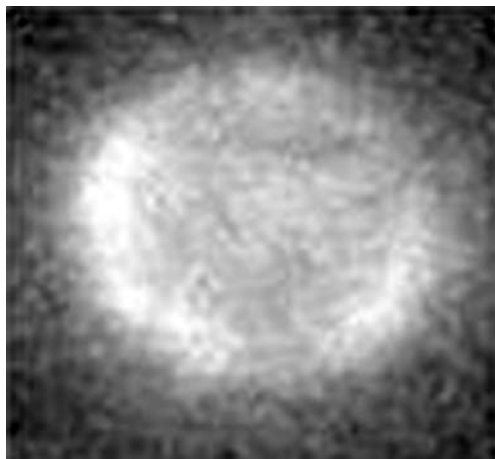


Рис. 1. P_2X_7 -позитивный макрофаг с мембранной локализацией P_2X_7 -рецепторов ($\times 450$).

инактивированного теплом *St. aureus* (штамм 209P) без отмывания от среды при бактериальной концентрации $5 \cdot 10^{10}$ /мл.

Выделение макрофагов осуществляли через 48 ч после моделирования перитонита, их извлечение осуществляли в асептических условиях путем перфузии брюшной полости охлажденным раствором Хенкса. Макрофаги отделяли от других клеток культивированием полученной клеточной взвеси в чашках Петри.

Детекцию экспрессии P_2X_7 -рецепторов проводили с помощью иммуноцитохимического анализа с использованием моноклональных антител к P_2X_7 (Sigma — Aldrich, США) по стандартной методике.

Функциональная активность макрофагов определялась спектрофлуориметрически по оригинальной методике и классическому НСТ-тесту. НСТ-тест проводили согласно Е. Д. Гольдбергу и соавт. [1]: 0,1 мл суспензии макрофагов смешивали с 0,1 мл PBS и оставляли на 5 мин при комнатной температуре (спонтанный тест) или с 0,1 мл стимуляторов (0,2 % зимозан, золотистый стафилококк $5 \cdot 10^6$ /мл, стимулированные тесты), затем во все пробирки добавляли НСТ. Из осадка делали мазки, докрашивали метиловым зеленым, оценивали количество формазан+ макрофагов и среднюю интенсивность окрашивания цитоплазмы формазан+ клеток с помощью Adobe Photoshop.

Спектрофлуориметрическая оценка функциональной активности макрофагов проводилась путем обработки кривых кинетики их аутофлуоресценции. Для количественной оценки макрофагальной активности использовали максимальную амплитуду интегральной кривой (в отн. ед.), для оценки спонтанной и стимулированной активности макрофагов (по аналогии с НСТ-тестом) — исходная величина флуоресценции кинетической кривой (в усл. ед.) и амплитуда флуоресценции интегральной кривой (в отн. ед.) в 2 временных точках: 5 мин (спонтанная активность), 30 мин

(стимулированная). Модуляция макрофагальной активности осуществлялась непосредственно перед измерением кинетики аутофлуоресценции зимозаном (0,2 %), золотистым стафилококком ($5 \cdot 10^6$ /мл), лигандом P_2X_7 -рецепторов аденозинтрифосфатом (АТФ) в 5, 100 мкМ и 1 мМ концентрации, неселективным (сурамин, 100 мкМ) и селективным (оАТФ, 100 мкМ) антагонистами P_2X_7 -рецепторов при предварительной инкубации клеток с 5 мкМ АТФ.

Для оценки эффективности спектрофлуориметрического метода определяли специфичность, точность и его чувствительность в сравнении с классическим НСТ-тестом по формулам:

$$\text{чувствительность} = \frac{[\text{истинно "+"}]}{[\text{истинно "+"} + \text{ложно "-"}]} \cdot 100;$$

$$\text{специфичность} = \frac{[\text{истинно "-"}]}{[\text{истинно "-"} + \text{ложно "+"}]} \cdot 100;$$

$$\text{точность} = \frac{[\text{истинно "+"} + \text{истинно "-"}]}{[\text{истинно "+"} + \text{истинно "-"} + \text{ложно "+"} + \text{ложно "-"}]} \cdot 100.$$

Статистический анализ полученных результатов включал определение нормальности распределения, дисперсии, среднего арифметического и среднего квадратичного отклонения, ошибки среднего, Т-тест (гетеро- или гомоскедастический) или тест Манна-Уитни, линейные корреляции Пирсона (r) или ранговые корреляции Спирмена (R). Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, m — ошибка среднего, p — уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноцитохимическая детекция пуринергических рецепторов подтипа P_2X_7 в чистой популяции перитонеальных макрофагов (свыше 90 % клеток макрофагальной природы) выявила иммунопозитивный материал в примембранной области перитонеальных макрофагов (рис. 1). Развитие острого перитонита характеризовалось увеличением количества P_2X_7 -экспрессирующих макрофагов (от $3,6 \pm 0,41$ % в контрольной до $8,6 \pm 1,25$ % в экспериментальной группе, $p = 0,001$, $n = 15$) без изменения субклеточной локализации пуринергических рецепторов.

Спонтанный и стимулированный зимозаном НСТ-тест (рис. 2, а) выявил следующие изменения: в контрольной группе количество метаболически активных макрофагов находилось в пределах $12,3 \pm 1,95$ % и $30,1 \pm 0,98$ %, в экспериментальной группе оно возросло до $21,3 \pm 3,01$ % ($n = 9$, $p < 0,05$) и $43,4 \pm 0,84$ % ($n = 9$, $p < 0,001$) для спонтанного и стимулированного теста соответственно. При стимуляции стафилококком наблюдалась тенденция к увеличению числа метаболически активных макрофагов в экспериментальной

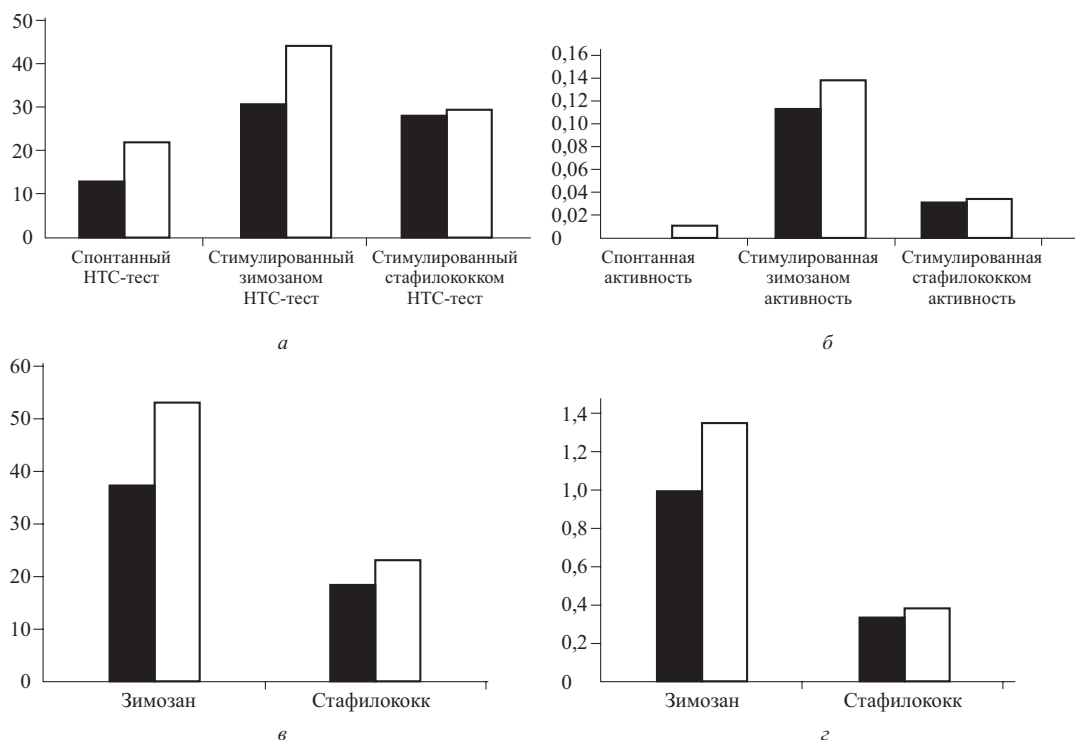


Рис. 2. Спонтанная и стимулированная активность макрофагов, зарегистрированная НСТ (а) и спектрофлуориметрическим (б) способами, средняя интенсивность окрашивания формазан-позитивных макрофагов (в) и амплитуда интегральной кривой аутофлуоресценции (г).

Темные столбики — контроль, светлые — перитонит.

группе ($28,8 \pm 0,46\%$) в сравнении с контрольной ($27,6 \pm 0,47\%$, $n = 9$, $p > 0,05$). При этом на фоне общего снижения активности макрофагов через 30 мин после их стимуляции наблюдается активация отдельных клеток, о чем свидетельствует достоверное повышение интенсивности окрашивания формазан⁺ клеток (рис. 2, в) при перитоните ($53 \pm 2,28$ ед. инт. — зимозан, $23 \pm 2,26$ ед. инт. — стафилококк) в сравнении с контролем ($37,1 \pm 3,39$ ед. инт., $p < 0,01$ — зимозан, $18,3 \pm 1,89$ ед. инт., $p < 0,05$, $n = 5$ — стафилококк).

Спектрофлуориметрический метод оценки функциональной активности макрофагов выявил тенденции, сходные с НСТ-тестом (рис. 2, б): 0 усл. ед., $n = 7$ — спонтанная активность, $0,112 \pm 0,0267$ усл. ед., $n = 7$ — стимулированная зимозаном, $0,030 \pm 0,0080$ усл. ед., $n = 7$ — стафилококком в контрольной группе, $0,009 \pm 0,0028$ усл. ед., $n = 6$ ($p < 0,05$) — спонтанная активность, $0,137 \pm 0,0219$ усл. ед., $n = 7$ — стимулированная зимозаном, $0,034 \pm 0,0093$ усл. ед., $n = 7$ — стафилококком при перитоните. Отмечено сходство между этими методами и в отношении активации отдельных макрофагов (рис. 2, в, г), что наблюдалось при изучении амплитуды флуоресценции интегральных кривых (рис. 2, г): $0,983 \pm 0,1842$ отн. ед., $n = 7$ — стимуляция зимозаном, $0,325 \pm 0,0486$ отн. ед., $n = 7$ — стимуляция стафилококком в контрольной группе,

$1,342 \pm 0,0881$ отн. ед., $n = 7$ — стимуляция зимозаном, $0,372 \pm 0,0605$ отн. ед., $n = 7$ — стимуляция стафилококком при перитоните. Чувствительность и точность НСТ-теста — по 98,2 %, чувствительность спектрофлуориметрического метода — 98,6 %, точность — 98,7 %, специфичность обоих методов — 100 %.

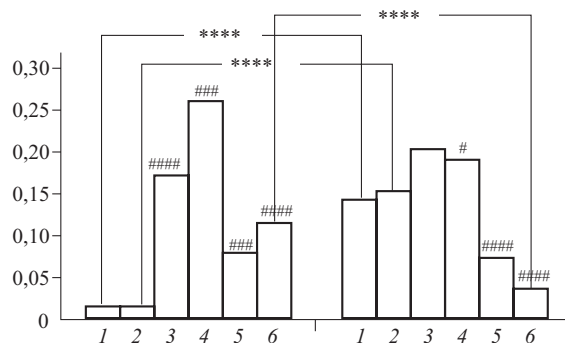


Рис. 3. Воздействие модуляторов P₂X₇-рецепторов на максимальную амплитуду интегральной кривой (в отн. ед.)

1 — исходная активность, 2 — АТФ 5 мкМ, 3 — АТФ 100 мкМ, 4 — АТФ 1 мМ, 5 — сурамин 100 мкМ, 6 — оАТФ 100 мкМ. Различия достоверны по сравнению: с контролем при: * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, *** — $p \leq 0,005$, **** — $p \leq 0,001$; с исходной активностью при: # — $p \leq 0,05$, ## — $p \leq 0,01$, ### — $p \leq 0,005$, #### — $p \leq 0,001$.

Развитие острого экспериментального перитонита сопровождалось резким усилением максимальной амплитуды интегральной кривой ($0,014 \pm 0,0008$ отн. ед. в контрольной, $0,142 \pm 0,0073$ отн. ед. в экспериментальной группе; $p < 0,001$, $n = 7$). В контрольной группе обнаружена положительная корреляционная связь умеренной силы между количеством P_2X_7 -экспрессирующих клеток и максимальной амплитудой ($r = 0,31$), в экспериментальной наблюдалось усиление этой корреляционной связи ($r = 0,63$).

Для экспериментальной проверки гипотезы о сопряжении между пуриnergическими рецепторами подтипа P_2X_7 и НАД(Ф)Н-оксидазой макрофагов изучали влияние модуляторов P_2X_7 -рецепторов (агонист — АТФ, антагонисты — сурамин и оАТФ) на максимальную амплитуду интегральной кривой.

Выявлено, что 5 мкМ АТФ практически не оказывает влияния на макрофагальную активность как в контрольной, так и экспериментальной группах. 100 мкМ и 1 мМ АТФ вызвали однонаправленное усиление макрофагальной активности в контроле и при перитоните, но при развитии воспаления АТФ в меньшей степени повлиял на активность макрофагов, причем в экспериментальной группе наблюдался “эффект насыщения” при увеличении концентрации АТФ (рис. 3). Полагаем, что при перитоните происходит десенсибилизация активных P_2X_7 -рецепторов к действию внеклеточного АТФ, что нарушает эффективность сопряжения между ними и НАД(Ф)Н-оксидазой.

Неселективный антагонист рецепторов (сурамин, 100 мкМ) и селективный антагонист пуриnergических рецепторов P_2X_7 подтипа (оАТФ, 100 мкМ) вызвали разнонаправленные изменения максимальной амплитуды интегральной кривой в контрольной и экспериментальной группах (рис. 3): в контроле наблюдалось усиление активности, при перитоните — достоверное ослабление. Разнонаправленный характер влияния антагонистов на бактерицидную активность макрофагов в контрольной и экспериментальной группах свидетельствует о различном характере воздействия этих антагонистов на неактивные и активные ферменты.

С учетом данных об особенностях экспрессии P_2X_7 на клетках моноцитарно-макрофагального ряда, очевидно, что увеличение количества P_2X_7 -позитивных клеток в очаге воспаления свидетельствует о миграции большого числа моноцитов и их скорой дифференцировке в метаболически активные макрофаги.

Результаты, полученные при использовании обоих методов регистрации функциональной активности макрофагов (НСТ-тест и спектрофлуориметрический метод), характерны для развития острого воспаления. Выявлены преимущества использования спектрофлуориметрического метода в сравнении с часто используемым НСТ-тестом: отсутствие субъективизма, регистрация максимальной активности в течение заданного временного промежутка (при использовании НСТ-тес-

та берутся только значения нулевой точки — спонтанная активность и через 30 мин после добавления стимулятора — стимулированная активность, при этом значение 30-й минуты не обязательно максимальное), высокая точность, чувствительность и специфичность.

Зарегистрированные изменения характера течения НАД(Ф)Н-ассоциированных процессов в перитонеальных макрофагах не только отражают их функциональную активность, но и могут явиться следствием модуляции экспрессии P_2X_7 -рецепторов. Действительно, обнаруженные нами положительные корреляционные связи между количеством P_2X_7 экспрессирующих клеток и макрофагальной активностью в контрольной и экспериментальной группах, свидетельствуют о возможном прямом или опосредованном участии P_2X_7 -рецепторов в регуляции функциональной активности макрофагов.

Результаты, полученные при воздействии модуляторов P_2X_7 -рецепторов, свидетельствуют о влиянии АТФ на активацию макрофагов в контрольной и экспериментальной группах и о разнонаправленном влиянии блокаторов P_2X_7 -рецепторов на малоактивные (в контроле) и активированные (при перитоните) макрофаги. На основании наличия корреляций между уровнями экспрессии P_2X_7 -рецепторов и функциональной активностью макрофагов, а также однонаправленного характера воздействия различных концентраций АТФ на макрофагальную активность, выявлено сопряжение между активацией P_2X_7 -рецепторов и НАД(Ф)Н-оксидазой макрофагов в норме и при перитоните.

ВЫВОД

Нуклеотидные P_2X_7 -рецепторы участвуют в активации перитонеальных макрофагов мышей в норме и при перитоните.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. П. Шахов, *Методы культуры ткани в гематологии*, Изд-во “ТГУ”, Томск (1991).
2. А. Н. Зубов, Л. Н. Писарева, Информационный бюллетень РФФИ, **4**(4), 300 (1996).
3. P. Chiozzi, J. M. Sanz, D. Ferrari, et al., *J. Cell Biol.*, **138**(3), 697 – 706 (1997).
4. A. N. Guerra, P. L. Fiset, Z. A. Pfeiffer, et al., *J. Endotoxin Res.*, **9**(4), 256 – 263 (2003).
5. B. D. Humphreys, J. Rice, S. B. Kertesz, G. R. Dubyak, *J. Biol. Chem.*, **275**(35), 26792 – 26798 (2000).
6. J. D. Ly and A. Lawen, *Redox. Report.*, **8**(1), 3 – 21 (2003).
7. R. A. North, *Physiological Reviews*, **82**(4), 1013 – 1067 (2002).
8. A. Sikora, J. Liu, C. Brosnan, et al., *J. Immunol.*, **163**, 558 – 561 (1999).
9. B. C. Suh, J. S. Kim, U. J. Namgung, et al., *Immunol.*, **166**(11), 6754 – 6763 (2001).
10. M. Thakker, J. S. Park, V. Carey, and J. C. Lee, *Infect. Immun.*, **66**(11), 5183 – 5189 (1998).

THE ROLE OF P_2X_7 RECEPTORS IN MODULATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES IN MICE WITH MODEL PERITONITIS

N. A. Malinovskaya, A. B. Salmina, A. A. Karacheva, V. V. Salmin, Yu. A. Uspenskaya, O. L. Lopatina,
A. G. Sokolovich, A. V. Stepanenko, O. V. Peryanova, and L. D. Zykova

Krasnoyarsk State Medical Academy, ul. P. Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia;

Krasnoyarsk Regional Hospital, ul. P. Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia;

Krasnoyarsk State University, Svobodnyi pr. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

The role of P_2X_7 receptors in modulation of the functional activity of macrophages in mice with model peritonitis has been studied. It is established that the functional activity of murine macrophages under such conditions is increased, which is accompanied by the growth of $P_2X_7^+$ macrophages and a bidirectional change of the their functional activity under the action of P_2X_7 modulators. The role of P_2X_7 -associated mechanisms in regulation of the macrophage activity during inflammation is discussed.