ИНДУКЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМПОНЕНТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ СТЕНКИ

Ильинская А.Н., Пичугина Л.В., Олиферук Н.С.,
Львов В.Л., Пинегин Б.В.

ГНЦ- Институт иммунологии МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Макрофаги под воздействием комплекса веществ мурамилпептидной природы (КВМПП), извлеченных из клеточной стенки грамотрицательных бактерий, претерпевают ряд изменений, сходных с процессом созревания, описанным для дендритных клеток. Для “созревших” макрофагов характерно снижение функции захвата, что сопровождается увеличением бактерицидной активности. У макрофагов изменяется поверхностная экспрессия молекул: уменьшается уровень паттерн распознающих структур, рецепторов, опосредующих поглощение микроорганизмов. При этом отмечается увеличение уровня экспрессии антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул. Изменяется цитокиновый профиль: увеличивается синтез IL-12, TNF α , IL-6.

Ключевые слова: макрофаги, мурамилпептиды, созревание, IL-12, TNF α , IL-6, фагоцитоз, бактерицидность.

A. Il'inskaya, L. Pichugina, N. Olfieruk, V. L'vov, B. Pinegin

MATURATION OF MACROPHAGES UNDER THE INFLUENCE OF MURAMYL PEPTIDES

Abstract. Muramyl peptides from bacterial cell wall trigger the modifications in macrophages similar to maturation observed with dendritic cells. Mature macrophages reduced their capacity for phagocytosis, comparing with control, while the bactericidal activity increased. Phenotype analysis of human macrophages exposed to muramyl peptides showed the increasing expression of costimulatory receptors and antigen presenting molecules. On the other hand, there was downregulation of receptors involved in recognition and engulfing of microorganism. In response to bacterial component macrophages secreted several cytokines: IL-12, TNF α , IL-6. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 1, pp 21-26)

Макрофагам принадлежит одна из ключевых ролей в создании линии защиты организма от бактериальной инвазии. Реализация этой функции осуществляется за счет прямого воздействия: узнавания, поглощения и уничтожения микроорганизма, а также непрямого механизма – процессинга и представления антигенных детерминант Т-клеткам [6]. На основании этих свойств макрофаги относят к классу профессиональных антигенпрезентирующих клеток, основными представителями которых являются дендритные клетки. В организме дендритные клетки представлены в

двух состояниях: незрелом и зрелом. Незрелые дендритные клетки не способны представлять антигены и стимулировать Т-клетки, но энергично поглощают антигены путем фагоцитоза, пиноцитоза и опосредованного рецепторами захвата. Зрелые дендритные клетки перестают захватывать новые антигены, но приобретают способность представлять ранее поглощенный антигенный материал и индуцировать клеточный ответ, что связано со значительным повышением экспрессии HLA и костимуляторных молекул [1]. В этой связи представляет интерес, претерпевают ли подобные изменения макрофаги-клетки, обладающие менее выраженными антигенпрезентирующими способностями. В качестве агента, способного вызвать активацию макрофагов, был выбран компонент пептидогликана бактериальной стенки, обладающий таким же иммуностимулирующим и адьювантным эффектом, как и целые клетки микобактерий. Из клеточ-

Адрес для переписки:

Ильинская А.Н. Институт иммунологии, лаб.
иммунодиагностики.
Тел.: (095) 117-76-49.
E-mail: ailinskaya@yandex.ru

ной стенки грамотрицательных бактерий был выделен комплекс веществ мурамилпептидной природы (КВМПП), содержащей 80% димера N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил пентапептида, а также небольшие количества соответствующего мономера и аналогичного тетрапептидного производного.

Материал и методы

Получение макрофагов и дендритных клеток

Мононуклеарные клетки, выделенные из лейко-массы, получали центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho=1,077\text{ г/см}^3$, ПанЭко). Затем мононуклеарные клетки центрифугировали 5 раз при 120g в течение 5 минут для удаления тромбоцитов. Выделенные клетки оставляли для адгезии в течение 1ч в культуральной среде (RPMI 1640(ICN), 1%AB человеческой плазмы (ICN), 2мМ глутамина (ICN), пируват Na (ПанЭко), витамины (ПанЭко), гентамицин 80 мкг/мл (KRKA)) на пластиковых чашках Петри (Costar) при 5% CO_2 и 37°C. Неприлипшие клетки удаляли [2]. Прилипшие клетки культивировали в течение 7 дней в полной культуральной среде (RPMI 1640, 10%FCS(ICN), 2мМ глутамина, пируват Na, витамины, гентамицин 80мкг/мл) в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) 80нг/мл (Leucostax, Shering-Plough) при CO_2 5% и 37°C. Для получения дендритных клеток моноциты культивировали в присутствии GM-CSF и IL-4 20нг/мл (R&D). На 3 и 5 день отбирали 1мл и добавляли свежей среды, содержащей цитокины. Методика получена ГМПП.

Стимуляция и фенотипический анализ

На 7 день культивирования к клеткам добавляли КВМПП 100 мкг/мл. Через 24 часа собирали супернатант и замораживали, а клетки снимали с чашки Петри культуральным скребком (Costar). Собранные клетки отмывали холодным ФСБ (фосфатно-солевой буфер). Для анализа фенотипа клетки 2×10^5 инкубировали с моноклональными антителами 30 минут при 4°C. Для оценки поверхностной экспрессии молекул использовали антитела CD80, CD86, CD40, CD54 (Caltag), меченые ФИТЦ; HLA-DR, CD11b (Caltag), антитела к маннозному рецептору (Immunotech), Toll like receptor 2 (TLR2) и Toll like receptor 4 (TLR4) (Bioscience), меченые фикоэритрином. Предварительно проводили блокирование Fc рецепторов с помощью немеченых антител к CD16, CD32, CD64 (Caltag). Макрофаги дважды отмывали холодным ФСБ с 0,02% ЭДТА. Отмытые клетки фиксировались ФСБ, содержащим 1% параформальдегида. Клетки анализировали на проточ-

ном цитометре FACSCalibur при помощи программы CellQuest (Becton Dickinson).

Оценка поглотительной активности макрофагов

Для оценки фагоцитарной активности макрофагов использовали *St.aureus*, меченый FITC [3]. В лунку 96-луночного круглодонного планшета вносили 180 тыс. макрофагов, 9 млн ФИТЦ-меченого *St. aureus*, реакцию ставили в присутствии 10% пуловой сыворотки и инкубировали 30 мин при 37°C. Макрофаги осаждали 200 g 1,5 мин, отмывали однократно охлажденным ФСБ с 0,02% ЭДТА и ресуспендировали в 200 мкл того же раствора с добавлением 2% параформальдегида. Отмывка от несвязавшихся бактерий достигалась за счет ЭДТА и дифференцированного центрифугирования на низких оборотах.

Для анализа образцов на проточном цитометре использовали 3 параметра - P1 (FSC), P2 (SSC) и P3 (FL1). В окне Dot Plot по FSC и SSC выделяли популяцию макрофагов. Оценивали процент клеток, положительных по ФИТЦ-флуоресценции (поглотивших ФИТЦ-меченые бактерии).

Оценка бактерицидной способности макрофагов

Для оценки бактерицидной активности макрофагов использовали *St.aureus*, меченый ФИТЦ [4]. Реакцию внутриклеточного киллинга бактерий ставили в 96-луночных круглодонных планшетах: в подопытную лунку вносили 9 млн живых ФИТЦ-меченых бактерий и 180 тыс. макрофагов. Смесь инкубировали 20 мин. при 37°C в присутствии 10% пуловой сыворотки. Макрофаги осаждали центрифугированием при 200 g 1 мин. при +4°C и 2 раза отмывали ФСБ от несвязавшихся бактерий. Макрофаги ресуспендировали в 200 мкл ФСБ и инкубировали 1, 3 и 6 часов при 37°C. Макрофаги осаждали 200 g 1 мин. при +4°C, клетки разрушали 200 мкл 0,2% сапонины (ДиаМ) на 0,01M карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,5 в течение 5 мин., высвободившиеся бактерии осаждали 2000 g 10 мин. В лунку добавляли ФСБ с 2,5 мкг/мл пропидиума иодида (Sigma).

Анализ образцов на проточном цитофлуориметре: по параметрам SSC и FSC в режиме Dot Plot отбраковывали бактерии. По двум другим параметрам (FL1 (зеленая) и FL3 (красная флуоресценция) в следующем окне Dot Plot выделяли ФИТЦ-меченый стафилококк (правые квадранты), устанавливая окно дискриминации, чтобы исключить дебриз (левые квадранты). Проекцию окна, выделяющего зеленые и зелено-красные бактерии, на FL3 выводили в виде гистограммы со статистикой для автоматического подсчета процента убитых бактерий (двойная метка) по отношению к сумме убитых и живых (одинарная метка).

Определение цитокинов

Содержание цитокинов в супернатантах культивированных клеток определяли с использованием твердофазного ИФА с применением коммерческих тест-систем в соответствии с инструкциями, разработанными фирмами IL-12 p70 (Pharmingen), IL-1, IL-6, TNF α (Протеиновый контур)

Результаты

Воздействие КВМПП на процесс созревания дендритных клеток

Для того чтобы определить является ли вообще КВМПП фактором созревания, была оценена способность глюкозамурамилпентапептида индуцировать превращение незрелых дендритных клеток в зрелые. В отличие от макрофагов для дендритных клеток описан маркер зрелых клеток CD83. Полученные из CD14 позитивных моноцитов периферической крови в присутствии GM-CSF и IL-4 дендритные клетки не несли на своей поверхности маркеры основных линий мононуклеарных клеток (CD3, CD19/20, CD14, CD16/56). Для сравнения в качестве положительного контроля для индукции созревания дендритных клеток было выбрано сочетание фактора некроза опухоли- α 20 нг/мл (TNF α) и простагландина E₂ 250 нг/мл (ПГЕ₂) [3]. При оценке экспрессии CD83 было показано, что КВМПП вызывает созревание дендритных клеток, сопоставимое с созреванием, индуцируемым сочетанием TNF α и ПГЕ₂ (рис.1)

Воздействие КВМПП на поглотительную и бактерицидную активность макрофагов

В процессе созревания дендритных клеток после взаимодействия с микроорганизмами отмечают

уменьшение поглотительной активности этих клеток. Поскольку макрофаги являются активно фагоцитирующими клетками, представляло особый интерес, как будет изменяться их поглотительная и бактерицидная способности при воздействии бактериального препарата КВМПП. При исследовании 10 здоровых доноров оказалось, что спустя 30 минут инкубации не стимулированных макрофагов с *St. aureus*, процент фагоцитирующих клеток составил $87,4 \pm 12\%$. У клеток, подвергшихся воздействию КВМПП в течение 24 часов, отмечалось уменьшение поглотительной активности $73,3 \pm 13\%$. Бактерицидная способность не стимулированных макрофагов после 3х-часовой инкубации со *St.aureus* равнялась $24,2 \pm 4,5\%$, в то время как для клеток, стимулированных КВМПП $40,3 \pm 17\%$. На основании представленных данных, можно утверждать, что отмечается уменьшение поглотительной активности клеток, стимулированных КВМПП, что сопровождается повышением бактерицидной способности макрофагов, подвергшихся предварительному 24 часовому воздействию бактериальных препаратов.

Воздействие КВМПП на экспрессию молекул на поверхности макрофагов

Исследуемая популяция состояла из CD14 позитивных клеток, несущих маннозный рецептор, не представленный на поверхности моноцитов. При воздействии КВМПП отмечалось уменьшение экспрессии паттерн распознающих структур: маннозного рецептора (рис.2), рецепторов взаимодействующих с пептидогиканом и липополисахаридом: TLR2 и TLR4 соответственно (рис.3); рецепторов, опосредующих взаимодействие с иммуноглобулинами: CD16, CD64 (рис.4) (в то время как уровень экспрессии CD32 оставался таким же, как и у не стимулированных клеток), а также CD11b (рис.5).

Рис. 1. Влияние КВМПП (пунктирная линия) и TNF α + ПГЕ₂ (сплошная линия) на экспрессию CD83 на поверхности дендритных клеток. Окрашенная гистограмма – незрелые дендритные клетки.

Рис. 2. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию маннозного рецептора на поверхности макрофагов. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 3. Влияние KBMP (сплошная линия) на экспрессию TLR на поверхности макрофагов. Окрашенная гистограмма – нестимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 4. Влияние KBMP (сплошная линия) на экспрессию рецепторов, опосредующих взаимодействие с иммуноглобулинами. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Из костимулирующих структур молекула CD80 слабо представлена на поверхности макрофагов, более того, не отмечалось изменения уровня экспрессии при воздействии KBMP, однако под влиянием этого препарата выявлено увеличение экспрессии CD86 (рис.6). После воздействия KBMP увеличивалась интенсивность флуоресценции для CD40 (рис.7) и CD54 (рис.8). При исследовании 15 здоровых доноров у 11 из них отмечалось увеличение уровня экспрессии HLA-DR (рис.9). Представленная тенденция отмечалась и при воздействии меньших доз препаратов (данные не приведены)

Продукция цитокинов

Для реализации функции антигенпрезентирующих клеток необходима выработка макрофагами ряда цитокинов для привлечения и координации действия других клеток. Одним из ключевых цитокинов для формирования Th1 клеток является IL-12 [6]. Не стимулированные макрофаги практически не вырабатывали IL-12 p70 ($9,6 \pm 10,5$ пг/мл), в то время как уровень выработки цитокина клетками, стимулированными KBMP составил ($168,67 \pm$

$102,9$ пг/мл) (рис.10). При определении концентрации провоспалительных цитокинов в супернатанте получили следующие результаты: нестимулированные клетки почти не вырабатывали IL-6 ($4,9 \pm 9$ пг/мл), KBMP в дозе 100 мкг/мл приводил к продукции ($1539,5 \pm 429,1$ пг/мл) IL-6 (рис.11). KBMP оказался сильным индуктором выработки TNF- α ($3,2 \pm 1,3$ нг/мл), причем не стимулированные клетки не продуцировали TNF α (рис.12). На синтез IL-1 β KBMP не оказывал существенного влияния (данные не приведены).

Обсуждение

Незрелые антигенпрезентирующие клетки располагаются в местах возможного проникновения инфекционных агентов в организм [1]. На данном этапе дендритные клетки способны узнавать, поглощать и убивать микроорганизм, но при этом они обладают низкой способностью презентировать. В процессе созревания дендритной клетки происходит уменьшение фагоцитарной активности, снижается экспрессия паттерн распознающих структур, но приобретает способность представлять захваченный антигенный ма-

Рис. 5. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию CD11b. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 6. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию CD86. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 7. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию CD40. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

териал и индуцировать Т-клеточный ответ. В качестве фактора созревания макрофагов был выбран КВМП, который, как было показано, индуцировал созревание дендритных клеток, сопоставимое с действием “классического” фактора созревания $\text{TNF}\alpha$.

Уменьшение поглотительной активности отмечается у макрофагов, подвергшихся воздействию компонен-

Рис. 8. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию CD54. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 9. Влияние КВМПП (сплошная линия) на экспрессию HLA-DR. Окрашенная гистограмма – не стимулированные клетки, пунктирная линия – изотипический контроль

Рис. 10. Влияние КВМПП на продукцию IL-12

та бактериальной стенки КВМПП, что отражается в снижении захвата ФИТЦ-меченого *St. aureus*, однако при этом увеличивается бактерицидная активность макрофагов. Снижение поглотительной активности стимулированных макрофагов отчасти может быть результатом уменьшения экспрессии на поверхности клеток рецепторов, опосредующих захват: маннозного

Рис. 11. Влияние KBMP на продукцию IL-6 (пг/мл)

Рис. 12. Влияние KBMP на продукцию TNFα (пг/мл)

рецептора, CD11b, структур, взаимодействующих с Fc-концом IgG CD16, CD64. Помимо этого отмечается уменьшение экспрессии рецепторов, взаимодействующих с бактериальными паттернами: TLR2 и TLR4. Зрелые дендритные клетки характеризуются высокой экспрессией HLA II класса, коstimуляторных молекул CD40, CD86 и молекул адгезии CD54. Подобные изменения поверхностной экспрессии молекул наблюдаются и у макрофагов, подвергшихся воздействию KBMP: у большинства доноров увеличивается уровень экспрессии HLA-DR, CD86, CD40 и CD54.

Однако для реализации функции антигенпрезентирующих клеток, направляющим эффектом обладают цитокины. При оценке продукции цитокинов установили, что макрофаги, стимулированные KBMP, синтезируют IL-12. IL-12 индуцирует дифференцировку наивных Т-хелперов в Т-хелперы 1 типа, стимулирует формирование функционально активных

цитотоксических Т-клеток, активирует NK-клетки [5]. На основании этого можно утверждать, что макрофаги, стимулированные KBMP, являются индукторами Т-клеточного ответа 1 типа, принимая во внимание то, что синтез IL-1, который является индуктором образования IL-4, обеспечивающего дифференцировку в Т-хелперы 2 типа, не изменялся у «созревших» макрофагов. Помимо этого отмечался высокий уровень продукции TNFα KBMP стимулированными клетками. Макрофаги, подвергшиеся воздействию бактериального компонента синтезируют провоспалительный цитокин – IL-6, одной из основных функций которого является усиление синтеза антител. Однако образование IL-6 можно рассматривать как ответ на повышенную продукцию TNFα [5].

На основании представленных данных можно утверждать, что макрофаги также переживают процесс созревания, схожий с таковым у дендритных клеток. Этот процесс сопровождается изменением поверхностной экспрессии молекул, профиля синтезируемых цитокинов, а также поглотительной и бактерицидной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Межведомственной научно-технической программы «Вакцины нового поколения, диагностические системы будущего», направление 02.03 «Разработка новых тест систем для оценки и контроля коррекции иммунного и аллергического статуса человека».

Список литературы

1. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. - 2001. - № 4. - С. 7-16.
2. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. Адаптивное культивирование дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. - 2002. - №3. - С.56-62.
3. Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки поглотительной и бактерицидной функции гранулоцитов и моноцитов периферической крови. - 1999. - №9. - С.154-156.
4. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Пинегин Б.В. Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии // Иммунология. - 2000. - №2. - С.57-59.
5. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Рубакова Э.И. Система цитокинов. М. -1999.
6. Nau G., Richmond J., Schbesinger A., Jennings E., Larder E., Young R. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. PNAS 2002/ - Vol.99. - P.1503-1508.

поступила в редакцию 22.04.2004

отправлена на доработку 13.12.2004

принята к печати 21.12.2004