

РЕАКЦИИ СИСТЕМЫ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ МОНОНУКЛЕАРОВ НА ХРОНИЧЕСКУЮ ГИПЕРГЛИКЕМИЮ

© 2016 г. Т.С. Булавинцева* **, И.Г. Данилова* ** ***, С.А. Бриллиант* ** ***,
С.Е. Смирных* **, М.Т. Абидов****

*Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19;

**Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,
620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

***ГАОУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, Екатеринбург, ул. К. Маркса, 22а;

****НИИ иммунопатологии, 121351, Москва, ул. Молодогвардейская, 57/1

E-mail: omella@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.06.16 г.

Выявлена однотипная реакция клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в центральных и периферических органах иммунопоза и поджелудочной железе у крыс в условиях хронической гипергликемии. Показана активация моноцитопоза и рекрутирование клеток фагоцитирующих мононуклеаров в периферические ткани. Модуляция функциональной активности фагоцитирующих мононуклеаров 3-аминофталгидразидом способствует нормализации интенсивности моноцитопоза и снижению уровня макрофагальной инфильтрации тимуса, поджелудочной железы и парапанкреатических лимфатических узлов. Выявленные изменения свидетельствуют об участии фагоцитирующих мононуклеаров в адаптационных реакциях организма на хроническую гипергликемию.

Ключевые слова: хроническая гипергликемия, система фагоцитирующих мононуклеаров, иммуномодуляция.

Хроническая гипергликемия (ХГ), окислительный стресс и воспаление являются основными факторами развития осложнений при сахарном диабете. Доказано, что макрофаги участвуют в патогенезе таких поздних осложнений сахарного диабета как ретинопатия, нефропатия, атеросклероз [1]. Высокая концентрация глюкозы в периферической крови вызывает активацию секреции реакционно-активных форм кислорода, оксида азота и провоспалительных цитокинов моноцитами-макрофагами [2]. Популяции тканевых макрофагов и дендритных клеток представляют собой единую систему фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ). Согласно исследованиям последних лет, макрофаги/дендритные клетки во взрослом организме могут образовываться в ходе дифференцировки моноцитов, а в эмбриональном периоде развития за счет мезенхимы [3,4]. В ответ на изменение микроокружения клетки СФМ способны менять свой фенотип и спектр секреторируемых цитокинов, играя ключевую роль в регуляции

врожденного и адаптивного иммунного ответа, метаболизма и регенерации клеток. Изменение функциональной активности клеток СФМ (от провоспалительной к противовоспалительной) предоставляет возможность купировать воспалительный процесс и повысить уровень адаптационных возможностей органов и тканей в условиях хронической гипергликемии.

В предыдущих исследованиях в модели аллоксанового диабета у крыс нами показано уменьшение деструктивных изменений в органах иммунопоза и поджелудочной железе на фоне модуляции функциональной активности макрофагов [5]. Однако без уточнения характера реакции клеток СФМ на ХГ выяснить механизмы вовлечения макрофагов в описанные процессы не представляется возможным. В данном исследовании проведена оценка интенсивности моноцитопоза и особенности распределения СФМ в центральных и периферических органах иммунопоза, а также поджелудочной железе.

Целью исследования является оценка реакции клеток СФМ на ХГ и на иммуномодуляцию в условиях ХГ.

Сокращения: ХГ – хроническая гипергликемия, СФМ – система фагоцитирующих мононуклеаров.

Таблица 1. Биохимические показатели периферической крови крыс с хронической гипергликемией и после модуляции макрофагов на фоне ХГ

Показатели	Интактная группа	Хроническая гипергликемия длительностью 60 сут	Хроническая гипергликемия + 3-аминофталгидразид
Глюкоза, ммоль/л	5,85 ± 0,30	32,63 ± 0,77*	17,0 ± 2,95*#
Hb A1c, %	5,09 ± 0,23	8,77 ± 0,21*	4,09 ± 0,79#
Инсулин, мкг/л	1,26 ± 0,20	0,34 ± 0,04*	0,75 ± 0,05*#
Инсулиноподобный фактор роста-1, мкг/л	982 ± 174	327 ± 66*	699,1 ± 111#

Примечание. * – Статистически значимые различия с интактной группой животных при $P < 0,05$, # – статистические значимые различия с группой животных с ХГ длительностью 60 сут при $P < 0,05$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был выполнен на 30 здоровых крысах-самцах линии Wistar массой 250 ± 10 г. Условия содержания и обращение с экспериментальными животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU; Official Journal of the European Union, 2010). Хроническую гипергликемию моделировали с помощью токсической деструкции β -клеток поджелудочной железы аллоксаном, который вводили трехкратно через день в общей дозе 30 мг/100 г массы тела [4]. Все экспериментальные животные были разделены на три группы: группа 1 – интактные; группа 2 – крысы с ХГ длительностью 60 сут; группа 3 – крысы, которым через 30 сут после введения аллоксана осуществляли модуляцию функциональной активности макрофагов внутримышечным введением 3-аминофталгидразида в течение 30 суток в дозе 2 мг/кг.

В крови животных всех экспериментальных групп определяли концентрацию глюкозы («Новоглюк-К», ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и гликозилированного гемоглобина («Диабет-тест», ООО «Фосфосорб», Россия). Содержание инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 в сыворотке крови анализировали иммуноферментным методом (Millipore; США). Оценку интенсивности моноцитопоза осуществляли в ходе анализа мазков костного мозга бедренной кости крыс. Содержание моноцитов в периферической крови определяли с помощью гематологического анализатора Celly 70 (Biocode Nusel; Франция). Количественное распределение макрофагов в коре и медуллярной зоне тимуса, красной и белой пульпе селезенки, эндокринной и экзокринной частях поджелудочной железы оценивали в ходе иммуногистохимического исследования (anti-rat CD-68, clone ED1; Millipore; США). Для этого образцы тка-

ней экспериментальных животных фиксировали в забуференном 10%-м формалине, после чего заливали в парафин и готовили гистологические срезы толщиной 3–5 мкм.

Визуализацию и оценку особенности локализации макрофагов в центральных и периферических органах иммунопоэза и в поджелудочной железе оценивали с помощью конфокального микроскопа (LSM-710, Zeiss, Germany). Конфокальная микроскопия, обладающая высокой степенью разрешения и контрастностью изображения, позволяет оценивать особенности колокализации клеток в тканях, а также применять цифровые методы обработки изображений.

Данные в таблицах представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. Оценку статистической значимости различий между группами осуществляли с использованием непараметрического U -критерия Манна–Уитни (пакет Statistica 6.0, StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 60-е сутки после введения аллоксана у экспериментальных животных зафиксировано снижение концентрации инсулина в 3,5 раза, что вызвало развитие хронической гипергликемии, подтверждаемое выраженным повышением уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина крови в 5,4 и 1,7 раза соответственно. Также было зафиксировано уменьшение содержания инсулиноподобного фактора роста-1 в сыворотке крови более чем в два раза относительно интактных животных (табл. 1).

Анализ моноцитарного роста кроветворения у животных с ХГ показал активацию моноцитопоза, о чем свидетельствовало повышение доли монобластов в костном мозге и увеличение количества моноцитов в кровотоке более чем в шесть раз (табл. 2).

Таблица 2. Распределение клеток СФМ в центральных и периферических органах иммунопоза и поджелудочной железе крыс с хронической гипергликемией и после модуляции макрофагов на фоне ХГ

Показатели		Интактная группа	Хроническая гипергликемия длительностью 60 сут	Хроническая гипергликемия + 3-аминофталгидразид
Моноцитарный росток костного мозга	Монобласты, %	13,7 ± 0,5	22,7 ± 0,8*	15,9 ± 0,5#
	Промоноциты, %	16,8 ± 0,6	18,4 ± 0,5	14,5 ± 0,4#
	Моноциты, %	29,7 ± 0,9	25,3 ± 1,7	22,2 ± 0,4*
	Макрофаги, %	39,8 ± 3,8	33,8 ± 1,6	47,5 ± 1,8#
	Весь моноцитарный ряд, 10 ⁶ /100 г массы тела	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,4 ± 0,2
Периферическая кровь, Т/мл		0,20 ± 0,05	1,27 ± 0,12*	0,74 ± 0,1*#
Тимус, N/мм ²	Корковая зона	85,8 ± 8,1	152,5 ± 26,5*	69,8 ± 9,5#
	Медуллярная зона	270,5 ± 58,9	246,9 ± 35,5	164,3 ± 24,5
Селезенка, N/мм ²	Красная пульпа	498,6 ± 40,4	973,0 ± 19,4*	1162,7 ± 88,8*
	Белая пульпа	264,7 ± 37,3	286,8 ± 23,9	296,1 ± 36,2
Лимфотический узел, N/мм ²		574,2 ± 1,3	1154,4 ± 51,5*	604,7 ± 95,8#
Поджелудочная железа, N/мм ²	Ацинарная часть	12,5 ± 3,0	61,7 ± 12,0*	12,5 ± 3,1#
	Перидуктальная часть	286,5 ± 74,5	875,6 ± 201,1*	217,7 ± 31,8#
	Островки Лангерганса	28,5 ± 6,0	190,8 ± 56,9*	97,4 ± 14,1*#

Примечание. N – количество CD-68 позитивных клеток; * – статистические значимые различия с интактной группой животных при $P < 0,05$, # – статистические значимые различия с группой животных с ХГ 60 сут при $P < 0,05$.

В тимусе отмечалось повышение численности клеток СФМ (CD68⁺-клеток) преимущественно в кортико-медулярной зоне. Помимо этого увеличение количества макрофагов выявлено в красной пульпе селезенки, региональных лимфатических узлах, примыкающих к поджелудочной железе, а также в эндокринной и экзокринной частях поджелудочной железы (таблица 2).

Модуляция функциональной активности макрофагов в условиях ХГ способствовала снижению концентрации глюкозы, нормализации уровня гликозилированного гемоглобина и инсулиноподобного фактора роста-1, повышению уровня инсулина в крови относительно показателей животных без иммуномодуляции (табл. 1).

Интенсивность моноцитопоза соответствовала норме, однако скорость выхода моноцитов в кровотоки была увеличена, о чем свидетельствовали нормализация доли бластных форм моноцитарного ростка и снижение количества моноцитов в костном мозге, а также повышен-

ное количество моноцитов в кровотоке (табл. 2).

Количество СФМ (CD68⁺-клеток) в красной пульпе селезенки животных после модуляции функциональной активности макрофагов находилось на уровне группы животных длительностью ХГ 60 сут. При этом в тимусе, экзокринной части поджелудочной железы и паранкреатических лимфатических узлах их количество соответствовало показателям интактных животных, а в панкреатических островках – значительно снижалось (табл. 2).

Хроническая гипергликемия сопровождается гликозилированием гуморальных факторов и структурных белков, что приводит к нарушению выполняемой ими функции и изменению антигенного «образа» клеток [9]. С другой стороны, высокая концентрация глюкозы в периферической крови вызывает активацию секреции активных радикалов (NO[•] и O₂[•]) и провоспалительных цитокинов клетками СФМ [8]. Оба описанных процесса способствуют нарушению

микроциркуляции и повреждению клеток, что приводит к активации процесса рекрутирования фагоцитирующих клеток в поврежденные ткани, что и было показано в ходе проведенных нами гистологических исследованиях.

Результаты исследования указывают на развитие однотипной реакции клеток СФМ на ХГ, проявляющейся в активации моноцитопоза, а также макрофагальной инфильтрации селезенки, тимуса, поджелудочной железы и парапанкреатических лимфатических узлов. Такая реакция направлена на элиминацию поврежденных клеток. Увеличение количества клеток СФМ в красной пульпе селезенки связано с высокой интенсивностью элиминации из кровотока эритроцитов с измененной структурой и нарушенной функцией в результате гликозилирования гемоглобина. Выявлено накопление клеток СФМ в кортико-медулярной зоне тимуса, что связано со стимуляцией фагоцитоза активно апоптозирующих лимфоцитов. В поджелудочной железе выявляется выраженная макрофагальная инфильтрация панкреатических островков, известно, что гипергликемия является индуктором пролиферации макрофагов [2]. Иницирующим фактором для миграции макрофагов в панкреатические островки при ХГ являются происходящие в них деструктивные процессы. Значительные скопления клеток СФМ также выявлены в периваскулярной и перидуктальной зонах поджелудочной железы, где располагаются междольковые лимфатические сосуды, и в региональных лимфатических узлах. Вероятно, это связано с участием макрофагов в регуляции местного иммунитета в условиях ХГ.

В данном исследовании использовали модулятор функциональной активности макрофагов – 3-аминофталгидразид. В проведенных ранее исследованиях *in vitro* было показана его способность снижать секрецию провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-6) и активных радикалов (NO \bullet и O $_2\bullet$) активированными моноцитами-макрофагами [7,8]. Ранее мы установили, что модуляция 3-аминофталгидразидом способствует активации компенсаторных и репа-

ративных процессов в тканях на фоне аллоксанового диабета [5,9]. В данной работе выявлена системная реакция клеток СФМ на иммуномодуляцию 3-аминофталгидразидом в условиях ХГ, проявляющаяся в нормализации интенсивности моноцитопоза и снижении макрофагальной инфильтрации тканей. Выявленные изменения свидетельствуют об участии клеток СФМ в адаптационных реакциях организма на ХГ.

Полученные данные имеют большое фундаментальное значение, поскольку раскрывают общезначимые закономерности реакции клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в условиях хронической гипергликемии. Более того, результаты исследования демонстрируют перспективность использования модуляции функциональной активности макрофагов для разработки терапевтических стратегий коррекции нарушений углеводного обмена.

Исследования выполнены в рамках программы УрО РАН для фундаментальных исследований №15-3-4-17.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. W. Yoon and H. S. Jun, Ann. N.Y. Acad. Sci., № 928, 200 (2001).
2. P. Kumar, M. M. Swain, and A. Pal, Int. J. Biochem. Cell Biol. **73**, 82 (2016).
3. B. M. Bradford, D. P. Sester, D. A. Hume, and N. A. Mabbott, Immunobiology **216** (11), 1228 (2011).
4. F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, et al., Science **327** (5966), 656 (2010).
5. С. Ю. Медведева, Т. С. Булавинцева, И. Г. Данилова и др. Вестн. уральской академич. науки, № 2, 85 (2013).
6. I. G. Danilova, I. F. Gette, and T. S. Bulavintseva, Patent for invention № 2534411; 27.11.2014. Bulletin №33 (in Russian).
7. T. Jukić, M. Abidov, and A. A. Ihan, Coll. antropol. **35** (4), 1219 (2011).
8. T. Jukić, A. Ihan, and D. Jukić, Coll. antropol. **36** (2), 409 (2012).
9. Т. С. Булавинцева и И. Г. Данилова, Вестн. уральской медицинской академич. науки, №3, 11 (2014).

The Response of the Mononuclear Phagocyte System to Chronic Hyperglycemia

T.S. Bulavintseva* **, I.G. Danilova* ** *, S.A. Brilliant* ** ***,
S.E. Smirnyh* **, and M.T. Abidov******

**Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,
ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia*

***Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomayskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

****Institute of Medical Cell Technologies, ul. K. Marksa 22a, Yekaterinburg, 620026 Russia*

*****Institute of Immunopathology, ul. Molodogvardeyskaya 57/1, Moscow, 121351 Russia*

In the present study we revealed a common reaction of cells of the mononuclear phagocyte system in the central and peripheral immunopoietic organs and pancreas in rats with chronic hyperglycemia. The activation of monocytopoiesis and recruitment of mononuclear phagocytes in peripheral tissues were observed. The modulation of functional activity of mononuclear phagocytes by 3-aminophthalhydrazide contributes to normalization of monocytopoietic intensity and a decrease in the level of macrophagal infiltration in thymus, pancreas and peripancreatic lymph nodes. These changes indicate that mononuclear phagocytes are involved in adaptive response of the organism to chronic hyperglycemia.

Key words: chronic hyperglycemia, mononuclear phagocyte system, immunomodulation