

Склонность макрофагов к H₂O₂-индуцированному апоптозу как диагностический критерий воспалительного процесса

Трофимов В. А., Аксенова О. Н., Власов А. П.

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева

В реализации защитной программы воспаления макрофагам отводится важнейшая роль. Макрофаги не только участвуют в регуляции воспалительной реакции, но и активируют иммунную систему [Wang et al., 1996]. В этой связи, очевидно, что понижение реактивности макрофагов будет выступать одним из факторов, лимитирующих эффективность воспалительного ответа организма. Ограничение функциональных возможностей макрофагов в зоне повреждения приводит к незавершенности фагоцитоза и хронизации воспалительного процесса. Агрессивность среды очага воспаления меняется на разных стадиях патологического процесса, достигая своего максимума уже в стадию альтерации. Повреждение молекул липидов, белков, ДНК, определяет степень и глубину угнетения клеточных процессов и, в конечном итоге, гибель клеток по тому или иному альтернативному пути (апоптоз или некроз). Таким образом, рассматриваемая проблема может быть охарактеризована в рамках реализации генотоксического действия медиаторов воспаления и продуктов распада биомолекул, включая свободные радикалы.

В настоящей работе представлены данные о влиянии перекиси водорода (H₂O₂) на апоптоз перитонеальных макрофагов крыс линии Вистар (масса тела 250-280 г) при экспериментальном остром перитоните. Макрофаги получали путем промывания брюшной полости животных средой PRMI 1640 с добавлением 20%-ной телячьей сыворотки, 3%-ного раствора глутамин, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мг/мл) в стерильных условиях. Перитонеальную жидкость на холоду отмывали в среде PRMI 1640. В конечном разведении концентрация клеток составляла 3 млн./мл. Жизнеспособность макрофагов определяли в тесте с трипановым синим. Монослои перитонеальных макрофагов формировали на предметных стеклах и культивировали в чашках Петри в среде PRMI 1640 при 37°C в течение 3 часов. Апоптоз культивируемых макрофагов вызывали добавлением перекиси водорода в концентрациях 1 ммоль и 10 ммоль. Апоптотически измененные клетки выявляли методами флуоресцентной и световой микроскопии, используя акридиновый оранжевый, Hoechst 33258 (Sigma), краситель Гимза (Merk). Кроме морфологических критериев, для оценки апоптоза использовали флуориметрическое определение с помощью Hoechst 33258 при длинах волн возбуждения 355 нм и эмиссии 450 нм продуктов межнуклеосомной деградации ДНК [Mosser et al., 1992].

Обнаружено, что перитонеальные макрофаги, изолированные из брюшной полости крыс, спустя 10-12 часов после моделирования перитонита характеризуются высокой жизнеспособностью (до 98 %). В последующей динамике воспалительного процесса количество живых клеток, выделенных из брюшной полости крыс, уменьшалось.

Перекись водорода стимулировала гибель макрофагов, выделенных из очага воспаления и культивируемых в виде монослоев, как по пути апоптоза, так и некроза. Признаки апоптоза макрофагов проявлялись через 1 час после добавления H_2O_2 . У акридинового оранжевого максимум флуоресценции смещался в длинноволновую область спектра (замена зеленой флуоресценции на желто-зеленую). Неравномерность свечения в разных частях ядра свидетельствовала о конденсации хроматина. Форма ядра изменялась от округлой до неправильной. Апоптотические клетки, накапливающие Hoechst 33258, имели ярко-зеленое свечение хроматина, конденсированного по периферии, либо представлялись полностью фрагментированными на 3-5 частей. Живые клетки выводили Hoechst 33258 и имели тускло-зеленую флуоресценцию. Световая микроскопия показала наличие клеток меньшего размера, сморщенных и содержащих несколько фрагментов ядра, а также явление блеббинга, связанного с нарушением цитоскелета клетки.

Под влиянием перекиси водорода в концентрации 1 ммоль в монослоях макрофагов доля апоптотирующих клеток возрастала в среднем до 24 %. Некроз в популяции анализируемых клеток отмечался в редких случаях. Перекись водорода в концентрации 10 ммоль способствовала увеличению количества апоптотирующих макрофагов до 30 %, а некротически измененных клеток до 12 %.

В экссудате, полученном от крыс с острым перитонитом, развивающимся более 12 часов и характеризующимся высоким процентом гибели животных, под влиянием перекиси водорода наблюдалось увеличение доли некротических клеток и уменьшение числа макрофагов, гибнущих путем апоптоза.

Очевидно, что снижение функциональной активности макрофагов в зоне повреждения приводит к незавершенности воспалительного процесса. В связи с этим, выявление в экссудате макрофагов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса в брюшной полости. Апоптоз является оптимальным вариантом выбраковки поврежденных клеток и способствует в отличие от некроза оптимизации воспалительного процесса. В свою очередь, перекись водорода выступает эффективным индуктором апоптоза, позволяющим выявить и элиминировать популяцию клеток с ослабленным антиоксидантным потенциалом и

предрасположенных к генетическим повреждениям относительно безболезненно для организма.

1. Mosser D. D., Martin L. H. J. /Cell. Physiol.1992.V.151.P.561-570.
2. Wang Y., Mathews W. R., Guido D. M., Jaeschke H. Pharmac /Exp. Therap.1996. №2. P. 714-720.