

УДК 591.4:575.113.1:612.017.1:578.232

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕГОЧНЫХ МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ ОППОЗИТНЫХ ЛИНИЙ СВА И С57В1/6g

Потапова О.В., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В.,  
Шкурупий В.А., Лузгина Н.Г., Ковнер А.В.

*Научный центр клинической и экспериментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск*  
[potapova@soramn.ru](mailto:potapova@soramn.ru)

Изучены генетически детерминированные морфофункциональные особенности легочных макрофагов у интактных мышей-самцов оппозитных линий С57В1/6g и СВА. У мышей-самцов линии С57В1/6g, в отличие от мышей линии СВА, больше величина численной плотности легочных макрофагов и относительно большее содержание макрофагов, обладающих секреторной активностью, определяемой по экспрессии маркеров внутриклеточных энзимов (миелопероксидазы, катепсина Д, индуцибельной NO – синтазы).

**Ключевые слова:** оппозитные линии мышей СВА и С57В1/6g, легочные макрофаги, PCNA, миелопероксидаза, катепсин Д, индуцибельная NO–синтаза.

Инфекции, передающиеся воздушно-капельным путем, такие как грипп и ОРВИ, остаются в сфере особого внимания. Большинство возбудителей ОРВИ, особенно вирусы гриппа А, обладают тропностью к альвеолярному эпителию и вызывают у млекопитающих и человека заболевание с глубоким поражением легких [2].

Формирование местного иммунитета в легких как первой линии защиты организма при вирусных инфекциях осуществляется за счет легочных макрофагов, которые подразделяют на интерстициальные (периваскулярные, перибронхиальные) и альвеолярные. Все они входят в легочный компартмент системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Благодаря своей фагоцитозной и

секреторной активности легочные макрофаги играют ключевую роль в инициации и развитии воспалительного процесса в легких [10].

Выраженность воспалительного ответа и особенности клеточных реакций в легких млекопитающих при инфекционных заболеваниях в определенной мере зависят от исходной фенотипически детерминированной реактивности мононуклеарных фагоцитов и их регуляции [5]. Рядом авторов выявлены межлинейные отличия реагирования различных систем организма мышей оппозитных линий СВА и С57В1/6g на бактериальные и грибковые агенты – *M. tuberculosis* [3], *C. albicans* [1]. К сожалению, очень мало современных исследований

посвящено изучению генетической детерминации иммунного ответа у млекопитающих при гриппе и ОРВИ [4, 7]. На основании ранее описанных межлинейных различий можно предположить, что у млекопитающих с разной генетической программой имеют место как морфофункциональные различия клеток системы мононуклеарных фагоцитов, так и различные варианты реагирования этой системы на одинаковые патогены. Однако механизмы реализации генетически обусловленной предрасположенности или устойчивости к инфекциям, в том числе вирусным, обусловленные морфофункциональными характеристиками системы мононуклеарных фагоцитов, остаются малоизученными.

В связи с вышесказанным, целью данного исследования явилось изучение у мышей оппозитных линий СВА и С57В1/6g межлинейных морфофункциональных особенностей легочных макрофагов как вероятного фактора детерминации характера иммунного ответа при вирусных инфекциях.

#### **Методика исследования**

В исследовании были использованы 40 мышей-самцов оппозитных линий СВА и С57В1/6g двухмесячного возраста с массой тела 20-25 г, полученных из питомника Научно-исследовательского института клинической иммунологии СО РАМН. Мыши, выбранные для исследования, являются оппозитными по ряду признаков: по активности обменных процессов в печени [3], разной чувствительностью

к инфекционным агентам [1, 3, 4], структурно-функциональным характеристикам коры надпочечников [3], по количественному представительству клеток СМФ в различных органах [9].

Мышей-самцов выбранных оппозитных линий содержали на стандартной лабораторной диете со свободным доступом к воде и пище. Перед проведением эксперимента в течение 2-х недель их адаптировали к условиям содержания. Исследование проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755), с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации.

Для морфологического исследования использовали по 20 мышей каждой оппозитной линии, которых выводили из эксперимента путем дислокации позвонков в шейном отделе. Объектом исследования служили легкие. Образцы ткани получали из левого легкого (тотально) и из средних и нижних отделов правого легкого.

Для светооптического исследования полученный материал после фиксации в 10 % растворе нейтрального формалина обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилолов и заключали в парафин. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Иммунофенотипирование легочных макрофагов, оценку их пролиферативной и

функциональной активности проводили с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа с использованием непрямого стрептавидинбиотинового метода с применением специфических моноклональных антител: к маркеру макрофагального ряда CD68 («DBS»), маркеру пролиферации PCNA («Novocastra»), к маркерам индуцибельной NO-синтазы (iNOS) («Novocastra»), лизосомальных протеаз – катепсина Д («DBS») и миелопероксидазы («DBS»).

Для проведения ИГХ-исследования срезы легких подвергали депарафинизации, регидратации, демаскировке антигенов в микроволновой печи мощностью 700W. Время экспозиции с первичными антителами составляло 30 мин при температуре 37°C. Затем срезы инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом, DAB-субстратом и дополнительно докрасивали гематоксилином Майера.

Визуализацию проводили на микроскопе AxioImager A1 с фотокамерой AxioCam MRc (Carl Zeiss). Морфометрию структурных элементов тканей осуществляли с помощью окулярной сетки на 100 точек площадью  $3,64 \times 10^4$  мкм<sup>2</sup> (при определении численной и/или объемной плотности структур) и инструментов программы AxioVision (rel. 4,7). Определяли численную плотность (Nai) клеток СМФ легких в тестовой площади; средние величины диаметров макрофагов и их ядер. Исследовали долю клеток СМФ легких, экспрессирующих внутриклеточные энзимы, долю кле-

ток СМФ с потенциально пролиферативной активностью. Полученный результат выражали в процентах от общего числа клеток СМФ легких.

Средние величины исследованных параметров определяли с использованием стандартного пакета программ «Statistica», применяли t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при  $p$  менее 0,05.

### Результаты исследования

Методом обзорной световой микроскопии образцов ткани легких мышей оппозиционных линий C57Bl/6g и CBA изучали топографию легочных макрофагов. При этом отмечали, что большая часть из них – 68 % – были представлены альвеолярными макрофагами, расположенными на поверхности альвеол, другие – макрофаги интерстиция – были распределены в межальвеолярных перегородках перибронхиально и периваскулярно. Величины численной плотности клеток макрофагов легких и их размеров у мышей линии C57Bl/6g были выше, чем у мышей линии CBA, на 22,6 % и 16 % соответственно. Диаметры ядер не имели достоверных межлинейных различий.

Большая численность макрофагов в легких мышей-самцов линии C57Bl/6g, возможно, обусловлена большим содержанием у них моноцитов в периферической крови по сравнению с мышами линии CBA [9], так как поддержание и увеличение пула клеток СМФ происходит, в основном, за счет рекрутирования моноцитов крови, имеющих костномозговое происхождение [10].

Однако в последнее десятилетие рядом автором выявлена способность легочных макрофагов к синтезу ДНК, что не позволяет исключить определенный вклад пролиферации *in situ* в поддержание численности альвеолярных макрофагов [8]. Другие авторы связывают активацию синтеза ДНК в легочных макрофагах с усилением их синтезирующей и фагоцитарной активности, свидетельствующих о фенотипической дифференциации юных клеток СМФ [10].

В представленной работе исследована экспрессия ядерного маркера пролиферации PCNA в клетках СМФ легких мышей оппозитных линий. Показатель численной плотности PCNA-позитивных клеток был на 28,3 % выше у мышей линии C57Bl/6g по сравнению с аналогичным показателем у мышей линии СВА, что может свидетельствовать о высоком функциональном потенциале клеток системы мононуклеарных фагоцитов животных линии C57Bl/6g.

Известно, что взаимодействие макрофагов легких с вирусными частицами через Fc-рецепторы сопровождается активацией респираторного взрыва с избыточной секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов. Фагоцитоз и дальнейшая деградация микроорганизмов происходит в фаголизосомах макрофагов с помощью специализированных ферментных систем, наиболее значимыми из которых при вирусных инфекциях явля-

ются протеолитические ферменты из группы эндопептидаз – катепсин Д и миелопероксидаза, осуществляющие внутриклеточное расщепление белковых структур вирусов [4]. При ИГХ-исследовании функциональной активности макрофагов легких мышей-самцов оппозитных линий по экспрессии внутриклеточных энзимов было выявлено, что показатели численной плотности клеток, экспрессирующих лизосомальные протеазы (миелопероксидазу, катепсин Д), у мышей линии C57Bl/6g были большими в 1,3 раза, чем у мышей линии СВА (Табл.). При этом распределение иммунопозитивных гранул, содержащих секреторные протеазы, в цитоплазме клеток было равномерным у обеих линий животных.

Немаловажную роль в противовирусной защите отводят и системе оксида азота. Активация индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в альвеолярных макрофагах в первые сутки после инфицирования вирусами гриппа А способствует накоплению оксида азота (NO), ингибирующего электрон-транспортные группы ферментов вирусов, участвующих в цикле Кребса и синтезе ДНК [5]. Показатель численной плотности iNOS-позитивных клеток СМФ в легких мышей-самцов линии C57Bl/6g был выше на 20,5 % в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей-самцов линии СВА (табл.).

Морфофункциональные характеристики легочных макрофагов интактных мышей  
оппозитных линий C57Bl/6g и CBA (M±m)

Параметры исследования	Линии животных	
	Интактные мыши линии C57Bl/6g	Интактные мыши линии CBA
Численная плотность CD68+ легочных макрофагов (Nai) (тестовая площадь $3,64 \times 10^5$ мкм <sup>2</sup> )	10,12 ± 0,96	8,25 ± 0,26 <sup>a</sup>
- из них PCNA+- клетки, %	12,2 ± 0,56	9,51 ± 0,91 <sup>a</sup>
- из них экспрессирующие: iNOS, %	35,96 ± 1,97	28,61 ± 2,67 <sup>a</sup>
Cathepsin D, %	47,43 ± 2,86	36,02 ± 2,79 <sup>a</sup>
Myeloperoxidase, %	35,17 ± 2,47	26,67 ± 2,42 <sup>a</sup>
Средний диаметр альвеолярных макрофагов, мкм	9,44 ± 0,15	7,92 ± 0,14 <sup>a</sup>
Средний диаметр ядра альвеолярных макрофагов, мкм	5,63 ± 0,11	5,53 ± 0,08

*Примечание: «а» – достоверность отличия величин рассматриваемых параметров у мышей оппозитных линий C57Bl/6g и CBA.*

Учитывая полученные результаты, можно сделать предположение о более высоких функциональных возможностях СМФ мышей линии C57Bl/6g, что соотносится с литературными данными об устойчивости животных данной линии к воздействию многих патогенных факторов, провоцирующих формирование различных патологических состояний легких [6]. Возможно, легочные макрофаги мышей линии C57Bl/6g как регуляторы противовирусного ответа будут демонстрировать большую фагоцитозную и секреторную активность при моделировании вирусных инфекций с последующей элиминацией возбудителя, что, в свою очередь, может обусловить более ранний и полноценный противовирусный ответ.

Таким образом, выявленные межлинейные различия по количественному

представительству и функциональным возможностям клеток СМФ легких у мышей линий C57Bl/6g и CBA указывают на генетическую детерминацию морфофункционального состояния легочного компартмента СМФ. Это дополняет уже имеющиеся сведения об анатомо-физиологических особенностях данных линий и позволяет рекомендовать их в качестве моделей для изучения генетически детерминированных особенностей противовирусного ответа млекопитающих.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.», госконтракт № 02.740.11.0709.

#### Список литературы

1. Система мононуклеарных фагоцитов в постнатальном периоде у мышей, перенесших

- внутриутробное кандидозное инфицирование, при экспериментальном туберкулезе / А.П. Надеев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 141. № 1. С. 103-106.
2. Структурные изменения легких у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1 субтипа / Л.В. Шестопалова [и др.] // Вестник НГУ. 2008. Т. 6, вып. 3, ч. 2. С. 3-10.
  3. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М.: Изд-во РАМН, 2007. С. 109-150.
  4. Influenza A virus elevates active cathepsin B in primary murine DC / Burster T. [et al.] // *Int. Immunol.* 2007. 19. P. 645–655.
  5. Pulmonary alveolar epithelial inducible NO synthase gene expression: regulation by inflammatory mediators / Gutierrez H.H. [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 1995. 268. P. 501–504.
  6. Hayden F.G., Hay H.J. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992. 176. P. 119–130.
  7. Low-dose arsenic compromises the immune response to influenza A infection in vivo / Kozul C.D. [et al.] // *Environ. Health Perspect.* 2009. 117(9). P. 1441–1447.
  8. Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages // *J Immunol.* 2007. 179(6). P. 3488-94.
  9. Murciano C. [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008. 53(2). P. 214–221.
  10. Transcriptome profiling of primary murine monocytes, lung macrophages and lung dendritic cells reveals a distinct expression of genes involved in cell trafficking / Zaslona Z. [et al.] // *Respir Res.* 2009. P. 10-122.

## MORPHO-FUNCTIONAL FEATURES OF PULMONARY MACROPHAGES OF OPPOSED LINEAR MICE CBA AND C57Bl/6g

Potapova O.V., Cherdanceva L.A., Sharkova T.V.,  
Shkurupi V.A., Luzgina N.G., Kovner A.V.

*Scientific center of clinical and experimental medicine of the Siberian Branch  
of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk*  
[potapova@soramn.ru](mailto:potapova@soramn.ru)

**We studied genetically determined structural functional features of pulmonary macrophages of linear mice C57Bl/6g and CBA. Morphological study revealed, that mice C57Bl/6g in contrast to mice CBA were characterized by high numerical density of pulmonary macrophages. Simultaneously lungs of linear mice C57Bl/6g had high percentage of secretory cells, which expressed enzymes Myeloperoxidase, Cathepsin D and inducible NO-synthase.**

**Keywords: opposed linear mice CBA and C57Bl/6g, pulmonary macrophages, Myeloperoxidase, Cathepsin D, inducible NO-synthase, PCNA.**