

УДК 616.24-076:578.262.7

**ОТСУТСТВИЕ ГЕНА SP-D ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ
ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОГО СИНТЕЗА HSP70 В M2,
НО НЕ В M1 ФЕНОТИПЕ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ
МАКРОФАГОВ: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА- 10**

**Е. Н. Вассерман[#], Е. В. Абрамова[#], С. В. Круглов^{*},
С. В. Лямина, Ш. Л. Шимшелашвили, Ю. И. Малышев[@],
М. Ф. Беарс[#], А. Д. Гоу[§], И. Ю. Малышев**

*Московский государственный медико-стоматологический университет,
г. Москва, igor.malyshev@mtu-net.ru;*

**НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г. Москва, Россия;*

[#]Пенсильванский университет, Филадельфия, Пенсильвания, США;

[§]Ратгерс университет, Пискатавэй, Нью-Джерси, США

[@]Аделфи университет, Гарден Сити, Нью Йорк, США

Макрофаги играют важную сигнальную и регуляторную роль в иммунных ответах. В зависимости от микроокружения макрофаги могут альтернативно приобретать или провоспалительный M1, или противовоспалительный M2 фенотип. Для того чтобы выжить в очаге воспаления, макрофаги активируют синтез собственных внутриклеточных защитных стресс — белков HSP70. Поэтому факторы, которые могут влиять на способность макрофагов к индукции HSP70, представляют особый интерес для современной иммунологии и медицины. В качестве такого фактора серьезное внимание привлекает сурфактантный белок D (SP-D). Главным образом, SP-D продуцируется в легких, но недавно обнаружен и в других органах и тканях. Показано, что SP-D играет существенную роль в регуляции секреторной активности макрофагов. Однако важный вопрос, влияет ли SP-D на способность макрофагов к индукции стресс белков, и зависит ли это влияние от фенотипа макрофагов, до сих пор остается открытым. Для того чтобы ответить на этот вопрос, мы сравнили степень ЛПС-индуцированного синтеза HSP70 в разных фенотипах перитонеальных макрофагов, выделенных от нормальных и SP-D (-/-) мышей. Показано, что все три фенотипа макрофагов нормальных мышей отвечали примерно одинаковой значительной активацией синтеза HSP70 на действие 500 нг/мл ЛПС. Удаление гена SP-D привело к тому, что ЛПС-индуцированный синтез HSP70 в нативном M0 фенотипе был незначительно выше, в M1 фенотипе не изменялся, а в M2 фенотипе был более чем в 2 раза увеличен по сравнению с соответствующим фенотипом макрофагов нормальных мышей. Эти данные впервые показали, что SP-D вовлечен в регуляцию стресс-ответа макрофагов и отражают выраженную зависимость эффектов SP-D от фенотипа макрофагов. Повышение синтеза HSP70 в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей,

вероятно, опосредовано снижением продукции ИЛ-10. В целом наши данные еще раз подтверждают, что регуляторные эффекты SP-D зависят от фенотипа макрофагов, и свидетельствуют о важной роли SP-D в сопряжении и согласованной регуляции секреторной активности и клеточного стресс ответа в макрофагах.

Ключевые слова: сурфактантный белок D, макрофаги, стресс-ответ, стресс-белки, M1-M2 фенотипы макрофагов.

ABSENCE OF SP-D GENE LEADS TO STRENGTHENING OF LPS-INDUCED SYNTHESIS OF HSP70 IN M2, BUT NOT IN M1 PHENOTYPE OF PERITONEAL MACROPHAGES: POSSIBLE ROLE OF INTERLEUKIN-10

**E. N. Vasserman[#], E. V. Abramova[#], S. V. Kruglov^{*}, S. V. Lyamina,
Sh. L. Shimshelashvili,
Yu. I. Malyshev[@], M. F. Bears[#], A. D. Gou[§], I. Yu. Malyshev**

Moscow state university of medicine and dentistry, Moscow, igor.malyshev@mtu-net.ru;

^{}Scientific Research Institute of general pathology and pathophysiology*

RAMS, Moscow, Russia;

[#]University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA;

[§]Rutgers university, Piskataway, New Jersey, USA;

[@]Adelfi University, Garden City, New York, USA

Macrophages play important signaling and regulatory role in immune response. Depending on microenvironment macrophages can alternatively obtain either proinflammatory M1 or antiinflammatory M2 phenotype. To survive in the centre of inflammation macrophages activate synthesis of own endocellular protective stress proteins HSP70. Therefore factors which can influence ability of macrophages to induction HSP70 represent cardinal interest for modern immunology and medicine. As the example of such a factor close attention attracts surfactant protein D (SP-D). Mainly, SP-D is produced in lungs, but it was found recently in other organs and tissues. It was shown that SP-D plays an essential role in regulation of secretory activity of macrophages. However the important questions: whether SP-D influences the ability of macrophages to induce the synthesis of stress proteins and whether this influence depends on macrophages phenotype remain open nowadays. To answer this question we have compared the level of LPS-induced synthesis HSP70 in different phenotypes of peritoneal macrophages allocated from normal and SP-D (-/-) mice. It was shown that the response of all three macrophages phenotypes of normal mice was approximately identical with considerable activation of HSP70 synthesis as the result of 500 ng/ml LPS influence. Removal of SP-D gene has led to the fact that LPS-induced synthesis of HSP70 was slightly increased in native M0 phenotype, did not change in M1 phenotype, and was more than 2 times increased in M2 phenotype in comparison with corresponding phenotype

of macrophages of normal mice. This data for the first time showed that SP-D is involved in regulation of the stress response of macrophages and reflect the expressed dependence of effects of SP-D on macrophages phenotype. Increase of HSP70 synthesis in M2 macrophages phenotype of SP-D (-/-) mice is possibly mediated by decrease in production of interleukin-10 (IL-10). As a whole our data once again confirms that regulatory effects of SP-D depend on macrophages phenotype and specify the important role of SP-D in interface and coordinated regulation of secretory activity and cellular stress response in macrophages.

Keywords: surfactant protein D, macrophages, stress response, stress proteins, M1-M2 macrophages phenotype.

Введение

Макрофаги играют исключительно важную роль в иммунных ответах. Это связано с тем, что внедрение в организм чужеродного агента вызывает прежде всего мощную активацию макрофагов, выделение цитокинов и других медиаторов воспаления. При этом в зависимости от микроокружения макрофаги могут существенно модифицировать свою активность. Так, макрофаги, находящиеся в среде с низкими дозами бактериального липополисахарида (ЛПС) и /или IFN- γ , в ответ на действие стимулирующих факторов отвечают классической активацией, т. е. продукцией провоспалительных цитокинов, таких, как IL-1, TNF- α , IL-12 и IFN- γ , и генерацией активных форм кислорода и азота. Такой фенотип макрофагов получил название M1 [8]. M1 макрофаги обладают выраженными фагоцитирующими и бактерицидными свойствами и уничтожают внутриклеточных микробов, таких, как вирусы и бактерии, а также опухолевые клетки. Макрофаги, находящиеся в среде с IL-4, IL-13, TGF- β или глюкокортикоидами, формируют альтернативный M2 фенотип, который в ответ на действие стимулирующих факторов продуцирует противовоспалительные цитоки-

ны, такие, как IL-10, IL-13 [8]. M2 макрофаги уничтожают экстраклеточных паразитов, таких, как гельминты и грибы, содействуют ангиогенезу, репарации и ремоделированию тканей, но при этом могут способствовать опухолевому росту. Особая активация M2 фенотипа была обозначена новым термином «альтернативная активация» для подчеркивания контраста с «классической активацией» M1 макрофагов.

В очаге воспаления макрофаги функционируют в агрессивной среде, и для того чтобы выжить, макрофаги активируют синтез собственных внутриклеточных защитных стресс-белков HSP70 [7]. Индукция HSP70 представляет собой ключевой маркерный компонент так называемого стресс-ответа, который защищает макрофаги от некроза и апоптоза [7], индуцируемого различными воспалительными медиаторами. Таким образом, способность макрофагов к индукции HSP70, по сути, определяет, сможет ли макрофаг проявить свою иммунологическую активность в очаге воспаления. По сравнению с другими клетками макрофаги проявляют наибольшую способность активировать синтез HSP70 в ответ на действие провоспалительных цитокинов и компонен-

тов бактериальных клеток, включая ЛПС [7].

Очевидно, что факторы, которые могут влиять на процесс формирования фенотипа макрофагов, на их секреторную активность и способность к индукции HSP70, представляют кардинальный интерес для современной иммунологии и медицины.

В качестве такого фактора, в настоящее время серьезное внимание привлекает сурфактантный белок D (SP-D). SP-D является мультимерным Ca^{2+} -связывающим белком из семейства коллагеноподобных лектинов. Главным образом, SP-D продуцируется в легких [5]. Недавно было показано, что в зависимости от своей олигомерной структуры SP-D может связываться или с CD91, или SIRP- α (сигнальный ингибирующий регуляторный белок- α) на поверхности альвеолярных макрофагах и соответственно стимулировать про- или противовоспалительную активность макрофагов [5]. Основная функция легочных SP-D состоит в модулировании воспаления и иммунной защиты в легких. Было показано, что удаление SP-D гена (SP-D (-/-)) приводит к увеличению количества и размера макрофагов в легких, нарушению профиля сурфактантных фосфолипидов, увеличению активности металлопротеаз, оксидативному и нитрозативному стрессу [9], а также повышению базального уровня воспаления в легких с последующим развитием эмфиземы [3] и повышению восприимчивости организма к бактериальным и вирусным инфекциям.

Недавно SP-D был обнаружен не только в легких, но и в сердце, желудке и кишечнике [4]. После этого сразу возник важный вопрос: может ли SP-D регулировать се-

креторную активность других макрофагов, кроме альвеолярных? То есть является ли SP-D только локальным фактором легочного иммунитета или он также может быть вовлечен в иммунный ответ всего организма. Недавно мы получили данные, которые позволили положительно ответить на этот вопрос, а именно: мы показали, что SP-D фенотип-зависимым образом влияет на продукцию NO и цитокинов перитонеальными макрофагами. При этом оказалось, что SP-D также играет роль и в самом процессе альтернативного программирования фенотипа макрофагов. Вместе с тем, вопрос о том, как влияет SP-D на способность макрофагов к индукции стресс-белков, и зависит ли это влияние от фенотипа макрофагов, до сих пор остается открытым.

Цель исследования

Цель работы состояла в том, чтобы определить, влияет ли SP-D на способность макрофагов к индукции стресс-белков HSP70, и если да, то является ли этот эффект фенотип-зависимым. Для того чтобы ответить на этот вопрос, мы сравнили степень ЛПС-индуцированного синтеза HSP70 в разных фенотипах перитонеальных макрофагов, выделенных от нормальных и SP-D (-/-) мышей.

Материал и методы исследования

C57BL/6 мыши, не имеющие SP-D гена (SP-D (-/-)), были получены в лаборатории S. Hawgood и переданы в Пенсильванский университет США для дальнейших исследований. Сопоставимые по возрасту (8-10 недель) C57BL/6 нормальные мыши были использованы в качестве контроля. Мыши содержались в условиях аккредитованного vivария, не допускающих попадание пато-

генных микроорганизмов, в соответствии с протоколом Комиссии по содержанию животных (Пенсильванский университет, США). Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеального смыва контрольных и SP-D (-/-) мышей, которым за 4 дня вводили в / б 2 мл 4% бульона тиогликолята. Перитонеальные макрофаги культивировали в среде RPMI 1640 с 10%-ной сывороткой с 100 U/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в 48-ми луночных планшетах по 0,5x10⁶ клеток на лунку. Для получения M1 и M2 фенотипов макрофагов была использована методика Zhang and Morrison [2]. Для этого первичная культура нативных перитонеальных макрофагов была разделена на три пула. В первый пул для формирования M1 фенотипа было добавлено на 6 часов 0,5 нг/мл ЛПС (из *E. coli* O111:B4, List Biologic Laboratories, Campbell, CA); во второй пул для формирования M2 фенотипа — 5 нг/мл ЛПС. Третий пул служил контролем (нативный M0 фенотип). Для активации макрофагов использовали ЛПС в концентрации 500 нг/мл.

Для подтверждения феномена репрограммирования макрофагов оценивали продукцию маркерного для M1 фенотипа интерлейкина 12 (IL-12); и маркерного для M2 фенотипа IL-10. Для измерения цитокинов 200 мкл культуральной среды замораживали при -800С. Оценку содержания IL-12 и IL-10 проводили с помощью SearchLight® Technology multiplex cytokine assay (Pierce Biotechnology, Woburn, MA). Результаты представляли как M + CO и обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Отличие между группами считалось достоверным при $p < 0,05$.

Оценку содержания белка HSP70 проводили с помощью Вестерн-блот анализа. Для этой цели макрофаги лизировали в буфере, содержащем 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 25% глицерол, 0,01% Bromophenol Blue. Белки электрофоретически разделяли с помощью SDS PAGE и электрофоретически переносили на PVDF мембрану (Bio-Rad) в присутствии 48 mM Tris, 380 mM глицина, 0,1% SDS, 20% метанола, pH 8,3. Неспецифическое связывание на мембране блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS-Tween в течение ночи при 4°C. Затем блоты инкубировали в течение 1 часа с первичными моноклональными мышиными анти-HSP70 антителами, которые распознают индуцибельные HSP70, при разведении 1:1000 (Stressgen, Cat # SPA-810). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антимышинные антитела (Santa Cruz, Cat # sc-2005) в разведении 1:3000. Просмотр бэндос осуществлялся с использованием хемилюминесценции (ECL+, Amersham Inc., Pittsburgh, PA), количественное определение проводилось путем денситометрического сканирования экспонированных пленок или направленным просмотром на устройстве Kodak 440 Imaging System (New Haven, CT). Измерение HSP70 проводили до и через 24 часа после активации макрофагов с помощью ЛПС (500 нг/мл). Способность к индукции HSP70 выражали в процентах как отношение содержания HSP70 через 24 часа стимуляции ЛПС к исходному уровню HSP70 до стимуляции, которое принимали за 100%.

Результаты исследования и их обсуждение

Формирование M1 и M2 фенотипов макрофагов по методике Zhang и Morrison [2] мы подтвердили с помощью измерения цитокинов после стимуляции макрофагов ЛПС (рис. 1).

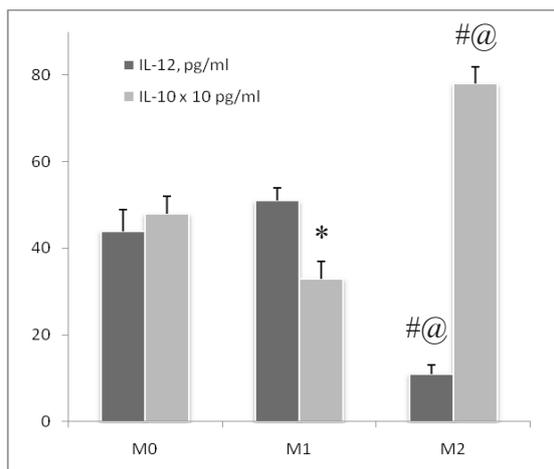


Рис. 1. Продукция IL-12 и IL-10 макрофагами M0, M1 и M2 фенотипа в ответ на действие 500 нг/мл ЛПС в течение 24 часов:

* — достоверность различий между M0 и M1 фенотипами

— достоверность различий между M0 и M2 фенотипами

@ — достоверность различий между M1 и M2 фенотипами

Действительно, M1 макрофаги продуцировали преимущественно провоспалительный цитокин IL-12, а M2 — противовоспалительный IL-10. Эти данные принципиально не отличались от уже опубликованных ранее. На рис. 1 видно, что отсутствие гена SP-D привело к увеличению ЛПС-индуцированной продукции IL-12 в M1 фенотипе и не повлияло на про-

дукцию этого фенотипа в M0 и M2 фенотипах. ЛПС-индуцированная продукция IL-10 была снижена в M0 и M2 фенотипах, и осталась неизменной в M1 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей по сравнению с нормальными макрофагами тех же фенотипов.

Данные, представленные на рис. 2, показывают, что все три фенотипа перитонеальных макрофагов нормальных мышей отвечали значительной активацией синтеза HSP70 на действие 500 нг/мл ЛПС.

Содержание HSP70 увеличивалось более чем в 100 раз. При этом оказалось, что предварительное репрограммирование макрофагов на M1 и M2 фенотипы практически не повлияло на способность нормальных макрофагов индуцировать синтез защитных стресс-белков. Наблюдалась лишь тенденция к снижению ЛПС-индуцированного синтеза HSP70 в M1 фенотипе по сравнению с M0 и M2 фенотипом по сравнению с M1.

В макрофагах SP-D (-/-) мышей в ответ на стимуляцию высокими концентрациями ЛПС (500 нг/мл) наблюдалась следующая картина (рис. 2). Удаление гена SP-D привело к тому, что ЛПС-индуцированный синтез HSP70 в нативном M0 фенотипе был незначительно выше, в M1 фенотипе практически не изменялся, а в M2 фенотипе был более чем в 2 раза увеличен по сравнению с соответствующим фенотипом макрофагов нормальных мышей. Эти данные отражают выраженную зависимость эффектов SP-D на синтез HSP70 от фенотипа перитонеальных макрофагов.

До 90-х годов исследования механизмов активации макрофагов фокусировались,

каких либо данных, которые помогли бы более конкретно интерпретировать этот результат.

Второй вопрос — почему удаление гена SP-D приводит к такому существенному увеличению индукции HSP70 в M2 фенотипе. Пока мы также не можем ответить на этот вопрос без дополнительных экспериментов. Вместе с тем увеличенный синтез HSP70 в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей является четким указанием на то, что по крайней мере в M2 фенотипе макрофагальный SP-D играет негативную роль в отношении ЛПС-индуцированного стресс-ответа макрофагов. Действительно, хорошо доказано, что SP-D может ограничивать взаимодействие ЛПС со своим рецептором TLR4 (Toll-like receptor 4) на поверхности макрофагов и, таким образом, ингибировать ЛПС-зависимую активацию NFκB [10]. Можно было бы предположить, что в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей резкое увеличение синтеза HSP70 в ответ на действие ЛПС связано с отсутствием негативного контроля SP-D и более эффективным связыванием ЛПС с TLR4. Недостающими звеньями этой гипотезы является отсутствие данных о том, что ЛПС-индуцированный синтез HSP70 вовлекает активацию NFκB.

Дополнительный намек на то, почему удаление гена SP-D приводит к такому существенному увеличению индукции HSP70 в M2 фенотипе, возникает при сопоставлении наших данных о влиянии удаления гена SP-D на продукцию цитокинов IL-12 и IL-10 с изменением синтеза HSP70 в разных фенотипах макрофагов (рис. 3).

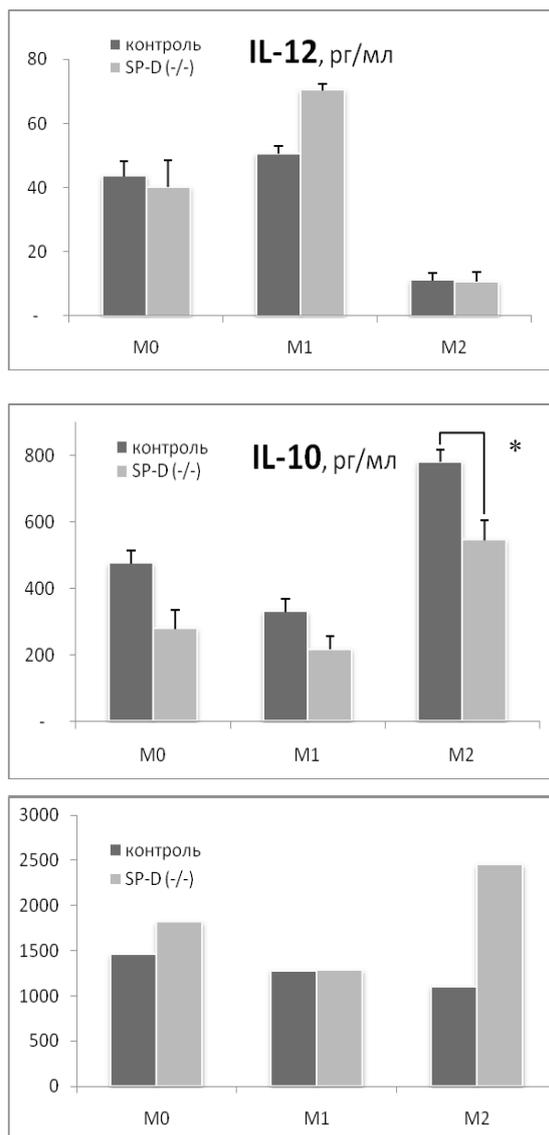


Рис. 3. Сопоставление влияния удаления гена SP-D на продукцию цитокинов и синтеза HSP70 в макрофагах M0, M1 и M2 фенотипов в ответ на действие 500 нг/мл ЛПС в течение 24 часов. Макрофаги были выделены из перитонеальной жидкости нормальных (контроль) и SP-D (-/-) мышей.

* — достоверность различий между контролем и SP-D (-/-).

Хорошо видно, что в отличие от IL-12, IL-10 имеет четкую отрицательную корреляцию с изменением синтеза HSP70 в разных

фенотипах при удалении гена SP-D. Можно предположить, что повышение синтеза HSP70 в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей опосредовано снижением продукции IL-10. Это предположение поддерживают данные о том, что IL-10 действительно может угнетать индукцию HSP70 [6].

В целом наши данные еще раз подтверждают, что регуляторные эффекты SP-D зависят от фенотипа макрофагов, и свидетельствуют о важной роли SP-D в сопряжении и согласованной регуляции секреторной активности и клеточного стресс-ответа в макрофагах.

Список литературы

1. Adams D.O., Hamilton T.A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins Lewis, C.E. McGee, J. O. eds. *The Macrophage*, 1992, 75-114 Oxford University Press Oxford, UK.
2. Atochina E., Beers M., Tomer Y. et al. Attenuated allergic airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice is associated with enhanced surfactant protein (SP) -D production following allergic sensitization. *Respir Res.*, 2003; 4: 15.
3. Botas C., Poulain F., Akiyama J. et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 95; 1998:11869-1187.
4. Fisher J.H., Sheftelyevish V., Ho Y.-S. et al. Pulmonary-specific expression of SP-D corrects pulmonary lipid accumulation in SP-D gene-targeted mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000; 278: L365-L373.
5. Guo C.J., Atochina-Vasserman E.N., Abramova H. et al. S-Nitrosylation of surfactant protein-D controls inflammatory function. *PLoS Biology*, 2004; 6 (11).
6. Hoegl S., Boost K.A., Czerwonka H. et al. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med.*, 2009; 103 (3): 463-70.
7. Malyshev I.Yu., Kruglov S.V., Bakhtina L.Yu. et al. Stress response and apoptosis in pro- and antiinflammatory macrophages. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2004; 138 (8): 140-143.
8. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. et al. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.*, 2008; 13: 453-61.
9. Wert S.E., Yoshida M., LeVine A. M. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2000: 5972-5977.
10. Yamazoe M., Nishitani C., Takahashi M. et al. Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. *J Biol Chem.*, 2008; 283 (51): 35878-88.