

М.А. Дергунова, Т.Г. Филатова, С.Я. Жанаева, Г. Коган, Т.А. Короленко

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА РАЗВИТИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ ДЕПРЕССИИ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск
Институт химии Словацкой АН, Братислава, Словакия

Исследованы свойства новых модификаторов биологического ответа — водорастворимых карбоксиметилированных β -1,3-гликанов (Институт химии Словацкой АН, Братислава). Изучена способность карбоксиметилированного β -1,3-гликана и хитокарбоксиметилгликана как стимуляторов макрофагов при депрессии макрофагов печени. Использована модель селективной депрессии макрофагов печени *in vivo* с помощью однократного введения мышам хлористого гадолиния (7,5 мг/кг, внутривенно). Обнаружено, что предварительное (за 24 ч) введение карбоксиметилированного β -1,3-гликана (25 мг/кг, внутривенно или внутривентально), хитокарбоксиметилгликана (25 мг/кг), как и зимозана (50 мг/кг, внутривентально) животным с депрессией макрофагов печени оказывало защитный эффект и предотвращало снижение количества моноцитов периферической крови. Введение зимозана и исследованных β -1,3-гликанов увеличивало скорость захвата гадолиния клетками печени, вероятно, за счет притока в орган макрофагов и повышения их эндоцитозной активности. Обнаружено, что исследованные водорастворимые β -1,3-гликаны вызывали увеличение массы печени и селезенки (относительной и абсолютной). Изолированное введение хлористого гадолиния интактным животным сопровождалось значительным снижением активности хитотриозидазы сыворотки крови крыс в период максимального захвата гадолиния клетками печени (48 ч), а при предварительном введении карбоксиметилированного β -1,3-гликана крысам с депрессией макрофагов значения показателя не отличались от интактных животных. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности эффективной фармакологической коррекции депрессии макрофагов печени с помощью стимуляторов полисахаридной природы.

Ключевые слова: депрессия макрофагов печени, хлористый гадолиний, лизосомы, β -1,3-гликаны

Модификаторы биологического ответа представляют большой интерес для клинической и экспериментальной медицины. Перспективно их использование, прежде всего водорастворимых и биodeградируемых соединений, в онкологии, хирургии, педиатрии и других областях медицины, при лечении различных воспалительных заболеваний печени (инфекционной, паразитарной природы) [3, 4]. Остается неясным механизм защитного действия этих соединений, особенно новых модификаторов биологического ответа при иммунодепрессивных состояниях [14]. В этом плане представляет интерес использование моделей депрессии макрофагов *in vivo*, которые позволяют подавить функциональную активность определенного пула макрофагов — печени, селезенки и легких.

В настоящее время используется относительно изученная модель селективной депрессии макрофагов печени *in vivo*, получаемая с помощью однократного введения животным (мышам и крысам) хлористого гадолиния в дозе 7,5–10 мг/кг [1, 8 — 13]. При этом из печени удаляется популяция крупных макрофагов, значительно подавляется

рецепторно-опосредованный эндоцитоз (но не пиноцитоз) макрофагов печени при отсутствии нарушений макрофагов легких и селезенки [2, 12]. Полагают, что восстановление численного и качественного состава (репопуляция) макрофагов печени происходит через несколько суток после введения животным хлористого гадолиния за счет рекрутируемых моноцитов периферической крови [12]. Однако остается неясным почему поражается популяция крупных макрофагов печени, не исследованы достаточно и свойства «восстановившихся» макрофагов. На модели с депрессией макрофагов печени у крыс нами обнаружены нарушения стабильности лизосом клеток печени — макрофагов и гепатоцитов (по увеличению свободной активности маркерных ферментов этих клеток — катепсина В и катепсина L соответственно), развивающиеся в результате внутрилизосомного накопления гадолиния как в макрофагах, так и частично — в гепатоцитах [15]. Показано наличие лизосомотропных свойств хлористого гадолиния, т.е. его способности избирательно концентрироваться *in vivo* в лизосомах определенных типов клеток (преимущественно макрофагов), которые представлены и у других лан-

Таблица 1

**Структура карбоксиметилированного
хитин-гликана (Хито-КМГ)**

Полисахарид	Карбоксиметилированный хитин-глюкан
Производство	Институт химии Словацкой АН, Братислава, Словакия
Источник	<i>Aspergillus niger</i>
Структура	$ \begin{array}{c} \left[\rightarrow^4 \text{GNac}^1 \rightarrow^4 \text{GNac}^1 \rightarrow^4 \text{GNac}^1 \rightarrow^4 \text{GNac}^1 \right. \\ \qquad \qquad \qquad \downarrow 6 \\ \left. \rightarrow^3 \text{G}^1 \rightarrow^3 \text{G}^1 \rightarrow^3 \text{G}^1 \rightarrow^3 \text{G}^1 \rightarrow^3 \text{G}^1 \rightarrow^3 \text{G}^1 \right] \\ \qquad \qquad \qquad \uparrow 1 \\ \qquad \qquad \qquad \text{G}^1 \end{array} $
Степень замещения	0,43 (43 % моносахаридных звеньев замещены карбоксиметильной группой в положении С-6)
Мол. масса	280 kDa
Доза	25 мг/кг

таноидов — соединений лантана и иттрия [17, 18]. Модели с введением *in vivo* соединений гадолиния, лантана и иттрия характеризуются подавлением скорости фагоцитоза введенных внутривенно частиц углерода макрофагами печени [15]. Наиболее изученной является модель селективной депрессии макрофагов печени, воспроизводимая с помощью однократного введения животным (мышам и крысам) хлористого гадолиния в дозе 7,5-10 мг/кг [12, 17]. Повышение дозы вводимого хлористого гадолиния более 10 мг/кг однократно приводит к депрессии макрофагов не только печени, но и легких [13]. Модель с использованием высоких доз хлористого гадолиния менее изучена по сравнению с используемой в большинстве случаев селективной депрессией макрофагов печени (доза хлористого гадолиния 7,5 мг/кг 24-48 ч спустя), как и действие хлористого гадолиния при повторных введениях соединения, когда неоднократно происходит репулпация макрофагов печени [11, 12, 13].

Цель исследования: изучить эффективность стимуляции макрофагов новыми химически модифицированными β -1,3-гликанами при фармакологически обусловленной депрессии макрофагов печени, вызываемой хлористым гадолинием.

Материалы и методы

Использовали взрослых самцов мышей линии СВА и СВА/С57В1, массой 20-25 г. (виварий Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. №755).

Хлористый гадолий (ХГ, любезно предоставлен проф. М. Хардонком, Голландия) вводили мышам однократно, внутривенно в хвостовую вену в дозе 7,5 мг/кг массы [12]. Контрольным животным вводили внутривенно соответствующий объем физиологического раствора. Забой животных производили в динамике через 0, 5, 15, 30, 60 минут и 24 часа спустя для изучения динамики накопления гадолиния в клетках печени и оценки активности ферментов лизосом.

Карбоксиметилированный β -1,3-гликан (КМГ) и хитокарбоксиметилгликан (Хито-КМГ) (оба препарата производства Института химии Словацкой АН) (Таблица 1) вводили животным однократно, внутривенно или внутривентриально, в дозе 25 мг/кг массы, а зимозан (Сигма, США) — в дозе 50 мг/кг массы, внутривенно. Мышей забивали через 24, 48 ч и 7 суток после введения препаратов. Контрольным животным вводили внутривенно соответствующий объем физиологического раствора. Подсчет числа и состава лейкоцитов периферической крови проводили, забирая кровь при декапитации животных.

После забоя мышей получали сыворотку крови, используемую для последующих биохимических исследований. Печень извлекали, промывали и гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы с 0,001 М ЭДТА, pH 7,2-7,4 и использовали для определения активности ферментов.

Активность хитотриозидазы сыворотки крови оценивали флуориметрическим методом с использованием в качестве субстрата 4-метилумбеллиферил β -D-N, N', N''-триацетилхитотриозид (Сигма, США) [16].

В отдельных экспериментах оценивали накопление гадолиния в печени после обеззоливания ткани печени, используя метод адсорбционной спектроскопии. Работу проводили на спектрометре L-70 (Jobber Iyon, Франция) на базе ЗАО «Каталист», Новосибирск (исследования проведены совместно с Плотниковой Г.И. и Петровой Е.А., приносим благодарность за помощь в работе). В качестве аналитической линии гадолиния использовали линию Gd II 342, 247 нм. Предел обнаружения гадолиния установлен по критерию 2 сигмы, фон составлял 0,005 микрограмм/см³ в интервале концентраций от 0,01 до 10 микрограмм/см³. Величина относительного стандартного отклонения не превышала 0,005. Данные обрабатывали статистически методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Масса печени и в меньшей степени — селезенки мышей (абсолютная и относительная) увеличены при введении интактным мышам КМГ и Хито-КМГ (Рис. 1, 2), вероятно, вследствие притока макрофагов, наблюдаемого также при воздействии зимозана [15]. Оба β -1,3-гликана при предварительном введении увеличивали массу печени у животных с использованием хлористого гадолиния (Рис. 1, 2).

Предварительное введение β -1,3-гликанов (за 24 ч) мышам ускоряло процесс захвата гадолиния

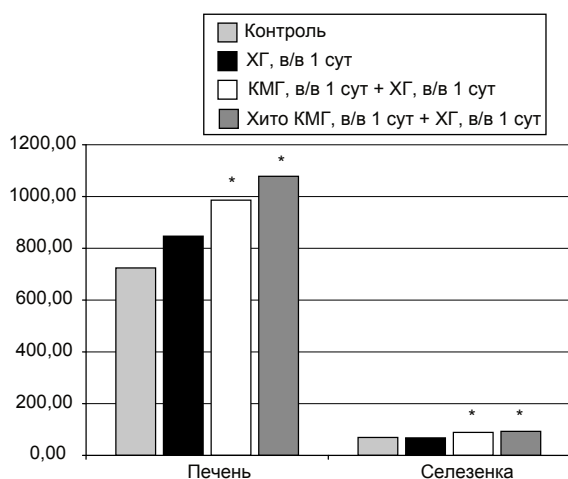


Рис. 1. Абсолютная масса печени и селезенки мышей СВА/С57ВL при введении ХГ (7,5 мг/кг) и КМГ и ХитоКМГ (25 мг/кг) * $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Число животных в каждой группе — 15

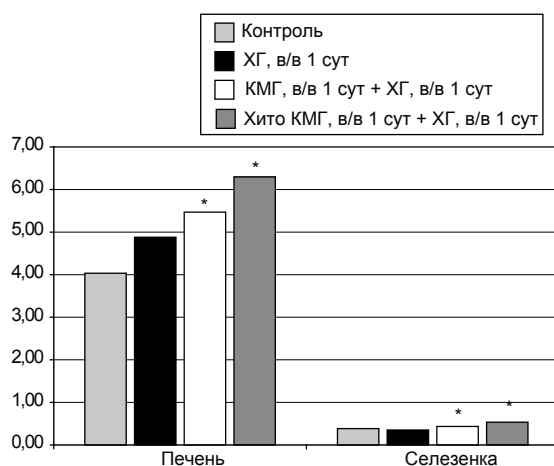


Рис. 2. Относительная масса печени и селезенки мышей СВА/С57ВL при введении ХГ (7,5 мг/кг) и КМГ и ХитоКМГ (25 мг/кг) * $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Число животных в каждой группе — 15

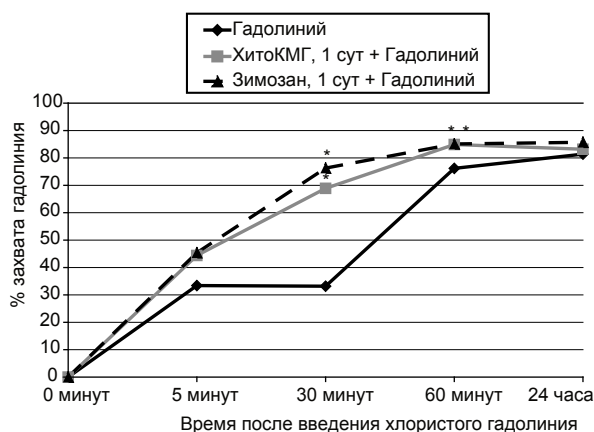


Рис. 3. Влияние введения зимозана (50 мг/кг, в/б) и ХитоКМГ (25 мг/кг, в/б) на захват гадолиния клетками печени (в процентах от введенной дозы)

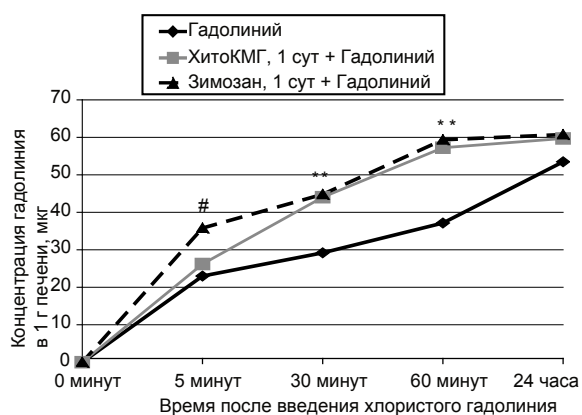


Рис. 4. Влияние предварительного введения β-1,3-гликанов на концентрацию гадолиния в печени мышей с селективной депрессией макрофагов печени.

* $P < 0,05$ по сравнению с группой с введением ХГ интактным мышам. Число животных в каждой группе — 15

клетками печени (Рис. 4, 5), увеличивая концентрацию гадолиния в ткани печени, как абсолютную (рассчитанную в микрограммах гадолиния на грамм ткани печени), так и относительную (захват хлористого гадолиния, рассчитанный в проценте от введенной дозы этого соединения). Наиболее значительны различия в захвате гадолиния печенью спустя 30 и 60 мин после введения мышам хлористого гадолиния, через 24 ч изменения незначительны (Рис. 4, 5).

Введение ХГ интактным мышам сопровождалось уменьшением относительного количества моноцитов периферической крови, не влияя существенно на общее количество лейкоцитов (1, 3 сут) (Рис. 3). Предварительное введение β-1,3-гликанов предотвращало падение количества моноцитов периферической крови, наблюдаемое при депрессии макрофагов печени (Рис. 3). Нами показано, что аналогичные изменения отмечены и в отношении поглотительной функции печени (по захвату час-

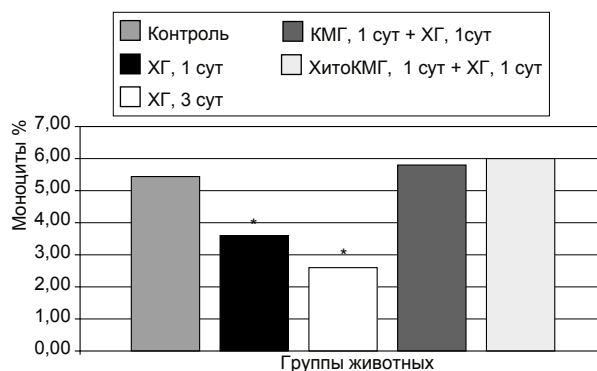


Рис. 5. Влияние ХГ, КМГ и ХитоКМГ (25 мг/кг, в/б) на относительное содержание моноцитов периферической крови мышей.

* $P < 0,01$ по сравнению с контролем. Число животных в контрольной группе — 15, в опытных — 8 — 10

тиц углерода): подавление скорости фагоцитоза при введении хлористого гадолиния и предупреждение депрессии с помощью предварительного введения исследуемых β -1,3-гликанов [15].

Следует отметить, что повышение массы печени при воздействии β -1,3-гликанов обеспечивает, возможно, повышенный захват хлористого гадолиния клетками печени путем рецепторно-опосредованного эндоцитоза; при этом увеличено как число макрофагов в печени, так и их эндоцитозная способность. Предварительное введение β -1,3-гликанов предупреждало снижение количества моноцитов в периферической крови, вызванное введением хлористого гадолиния.

Полагают, что хитотриозидаза сыворотки крови у человека имеет макрофагальное происхождение и показано повышение активности хитотриозидазы сыворотки крови при стимуляции макрофагов, и особенно при болезни Гоше — лизосомной болезни накопления человека, сопровождающейся формированием клеток Гоше — перегруженных непереаренным липидным материалом макрофагов [16]. Несмотря на то, что (в противоположность человеку) хиториозидаза у крыс не имеет макрофагального происхождения, как показано последними исследованиями, нами обнаружена корреляция между снижением активности хиториозидазы сыворотки крови и депрессией макрофагов печени при введении крысам и мышам хлористого гадолиния [15]. В настоящей работе показано восстановление сниженной активности хитотриозидазы при терапии β -1,3-гликанами депрессии макрофагов печени (Таблица 2).

Таким образом, предварительное введение мышам как КМГ, так и Хито-КМГ существенно предотвращает депрессию макрофагов печени при воздействии хлористого гадолиния. Механизм защиты в значительной степени связан с тем, что увеличение числа и функциональной активности макрофагов печени при предварительном введении мышам КМГ и Хито-КМГ происходит до депрессивного воздействия ХГ, так что число макрофагов печени существенно не снижается (вероятно, как и их эндоцитозная активность). Необходимо исследовать, какая популяция мак-

рофагов печени подвергается элиминации при воздействии ХГ на стимулированные полисахаридами макрофаги. Известно, что биологический эффект водонерастворимых β -1,3-гликанов, одних из основных компонентов зимозана, осуществляется за счет взаимодействия их с β -гликановыми рецепторами макрофагов; недавно обнаружены новые типы рецепторов — дектиновые, которые важны в проявлении биологического действия этих полисахаридов. При химической модификации путем карбоксиметилирования получают водорастворимые или частично водорастворимые β -1,3-гликаны, которые взаимодействуют с указанными выше рецепторами, а также, возможно, со скавенджер-рецепторами макрофагов. Действие водорастворимых β -1,3-гликанов (перспективных для клинической медицины) как стимуляторов макрофагов отличается от водонерастворимых β -1,3-гликанов с той же структурой и молекулярной массой [5]. Существенное отличие состоит в том, что введение водорастворимых β -1,3-гликанов не вызывает образования гранул в печени, наблюдаемых при воздействии зимозана и водонерастворимых β -1,3-гликанов (нежелательный побочный эффект). Согласно полученным в настоящей работе данным водорастворимые КМГ и Хито-КМГ способны предотвращать депрессию макрофагов печени и, следовательно, могут быть использованы при и при других состояниях как стимуляторы макрофагов. Защитное действие β -1,3-гликанов не отмечено нами в экспериментах, если использовали последующее (после хлористого гадолиния) введение мышам КМГ и Хито-КМГ. Очевидно, репопуляция макрофагов печени при воздействии β -1,3-гликанов при депрессии макрофагов печени имеет особенности, которые требуют дальнейшего исследования.

Изучаются возможности использования хлористого гадолиния в трансплантологии [6], в подходах к лечению опухолевых процессов [1], токсического гепатита (при введении четыреххлористого углерода) [7], на ранних этапах развития эндотоксмии [2]. Введение хлористого гадолиния вызывает уменьшение экспрессии β -2 интегринов, молекул адгезии [13], фактора некроза опухоли [8, 10], снижение продукции супероксида кислорода [18]. При предварительном введении ХГ показан усиленный захват окисленных ЛПНП на моделях атеросклероза [11]. Некоторые соединения, вызывающие депрессию макрофагов печени (метил-пальмитат), оказывают гепатопротективное действие на модели повреждения печени, вызванного галактозамином [6].

Данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что модель селективной депрессии макрофагов печени, вызываемая с помощью ХГ, может быть использована для оценки

Таблица 2

Влияние предварительного введения КМГ на активность хитотриозидазы в сыворотке крови мышей с селективной депрессией макрофагов печени

Группы животных	Активность хитотриозидазы, нмоль/мл в час
Контроль (интактные)	282,9 ± 23,72
ХГ, 2 сут	121,5 ± 12,20*
КМГ, 1 сут.+ХГ 2 сут	384,7±18,42 *
КМГ, 1 сут.+ХГ 7 сут	296,0±28,86

Примечание: * $p < 0,05$. Число животных в контрольной группе — 15, в опытных — 8 — 10.

эффективности ряда стимуляторов макрофагов, особенно новых модификаторов биологического ответа полисахаридной природы, предлагаемых в настоящее время.

CHEMICALLY MODIFIED POLYSACCHARIDE INFLUENCE ON DEVELOPMENT OF SELECTIVE LIVER MACROPHAGE DEPRESSION

M.A. Dergunova, T.G. Filatova, S.Ya. Zhanaeva,
G. Kogan, T.A. Korolenko

The role of carboxymethylated β -1,3-glucan and chito-carboxymethylated glucan as macrophage stimulators at liver macrophage depression was studied. There has been used a model of selective liver macrophage depression in vivo by means of a single introduction of gadolinium chloride (7,5 mg/kg, intravenously) to mice. It is found that prior introduction (prior 24 hours) of carboxymethylated β -1,3 glucan (25 mg/kg intravenously) and chito-carboxymethylated glucan (25 mg/kg) as well as zymosan (50 mg/kg) to animals with liver macrophages depression possessed the protective effect. Both zymosan and β -1,3-glucans revealed the signs of liver macrophage stimulation: increased number and phagocytic activity of liver macrophages, increased serum chitotriosidase activity. Model of selective liver macrophage depression was characterized by decreased number of liver macrophages and decreased serum chitotriosidase activity. Chito-KMG as well as zymosan increased uptake of gadolinium by liver cells during preliminary β -1,3-glucans administration. It was concluded that the model of selective liver macrophage depression is useful for study the effects of modifiers of biological response (polysaccharides with a structure like β -1,3-glucans).

Литература

1. Влияние стимуляции и депрессии макрофагов на развитие экспериментальных метастазов гепатомы ГА-1 и развитие аденокарциномы легких АЛ у мышей линии А/Sn / С.Я.Жанаева, Т.А. Короленко, Б.Г. Некрасов и др. // Бюл. exper. биол. — 2005. — № 7. — С. 39-42.
2. Гранулематозное воспаление печени при блокаде клеток Купфера хлоридом гадолиния / Д.Д. Церендоржиев, А.А. Зубахин, Д.Н. Маянский и др. // Бюл. exper. биол. — 1995. — № 10. — С. 336-369.
3. Манько В.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы / В.М. Манько, Р.В. Петров, Р.М. Хаитов // Иммунология. — 2002. — № 3. — С. 132-136.
4. Механизм защитного действия лизосомотропных соединений — стимуляторов макрофагов — при хроническом гепатите / Т.А. Короленко, К.Ш. Уразгалиев, Е.И. Верецагин и др. // Патогенез хронического воспаления — 2002. — № 3. — С. 132-136.
5. Шандула Й. Структура и некоторые характеристики дрожжевых β -D-гликанов / Й. Шандула, Г. Коган,

Л. Маслер // Вопросы мед. химии. — 1990. — №6. — С. 39-42.

6. Aggravating action of zymosan on acute liver damage in perfused liver of rats treated with D-galactosamine / T.-X. Cui, M. Iwai, T. Yamauchi, T. Shimazu // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 1998. — Vol. 275 (6). — P. 1361-1366.

7. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine / C.A. Rivera, B.U. Bradford, K.J. Hunt, et. al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2001. — Vol. 281 (1). — P. 200-207.

8. Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats — analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia / Y. Iimuro, H. Kohno, J. Itakura, et. al. // J. Leukocyte Biol. — 1994. — Vol. 55. — P. 723-728.

9. Diaz-Peromingo J.A. Influence of gadolinium-induced Kupffer cell blockade on portal venous tolerance in rat skin allograft transplantation / J.A. Diaz-Peromingo, A. Gonzalez-Quintela // European Surgical Research. — 2005. — Vol. 37. — P. 45-49.

10. Gadolinium chloride-induced hepatocyte proliferation is prevented by antibodies to tumor necrosis factor. / M.L. Rose, B.U. Bradford, D.R. Germolec, et. al. // Toxicology and Applied Pharmacology. — 2001. — Vol. 170. — P. 39-45.

11. Gadolinium chloride-induced Kupffer cell blockade increases uptake of oxidized low-density lipoproteins by rat heart and aorta / I. F. Usynin, A. V. Kharkovsky, N. I. Balitskaya, L. E. Panin // Biochemistry (Rus.). — 1999. — Vol. 64. — P. 620-624.

12. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation / M.J. Hardonk, F.W.T. Dijkhuis, C.E. Hulstaert, J. Koudstaal // J. Leukocyte Biol. — 1992. — Vol. 52. — P. 296-302.

13. Inhibition of macrophages with gadolinium chloride alters intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver during acute endotoxemia in rats / A. Nosheen, C.R. Gardner, E.J. Yurkow et. al. // Hepatology. — 2003. — Vol. 3 — P. 728-736.

14. Kaplowitz N. Drug-induced liver disease / N. Kaplowitz, L.D. Deleve. — M. Dekker, Inc. Medical, 2002. — 773 p.

15. Liver cysteine proteinases in macrophages depression induced by gadolinium chloride / T. Korolenko, I. Svechnikova, K. Urazgaliev et. al. // Adv. Exp. Med. Biol. — 1997. — Vol. 421. — P. 315-321.

16. Marked difference in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man / R.G. Boot, A.P. Bussink, M. Verhoek et. al. // J. Histochem. Cytochem. — 2005. — Vol. 53 (10). — P. 1283-1292.

17. Nagaoka M.R. Hepatic Clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein in experimental liver fibrosis / M.R. Nagaoka, M. Kouyoumdjian, D. R. Borges // Liver International. — 2003. — Vol. 23. — P. 476-483.

18. Neyrinck, A.M. Precision-cut liver slices in culture as a tool to assess the physiological involvement of Kupffer cell in hepatic metabolism / A.M. Neyrinck, C. Gomez, N. M. Delzenne // Comparative Hepatology. — 2004. — Vol. 3 (Suppl. 1). — P. 45-48.