УДК 612.221.3:612.821.44:616.831-092.4

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ И АУТОИММУННОМ ПОРАЖЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2014 М.А. Уракова, Р.Р. Тютина, А.Г. Илаева, Р.А. Латыпова

Ижевская государственная медицинская академия

Поступила в редакцию 05.12.2014

В работе проведено исследование функциональной активности альвеолярных макрофагов при алкогольном и аутоиммунном поражении головного мозга. Поглотительную активность клеток оценивали путем подсчета фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и индекса завершенности фагоцитоза. Установлено увеличение содержания макрофагов в бронхо-альвеолярных смывах при изучаемых патологиях. Как снижение фагоцитарной активности при алкоголизме, так и её увеличение при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите сопровождались незавершенностью фагоцитоза.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, алкоголизм, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

Альвеолярные макрофаги представляют собой первую линию защиты организма от патогенных возбудителей, поступающих через воздухоносные пути [4]. Уникальность этих клеток обусловлена участием как в механизмах врожденного, так и адаптивного иммунитета. Особенно важную роль макрофаги играют в механизмах доиммунной резистентности. Именно на мононуклеарных фагоцитах наиболее широко представлены толл-подобные рецепторы, предраспознавания назначенные ДЛЯ патогенассоциированных молекулярных паттернов (РАМР). Основная функция этих клеток – поглотительная, связана со способностью к фагоцитозу в естественных условиях различных микроорганизмов, а также многих веществ, в том числе органической и неорганической пыли, денатурированных белков, фосфолипопротеидов, гормонов, имммунных комплексов [2]. Функционирование альвеолярных макрофагов при достаточно высоком напряжении кислорода позволяет им использовать поглощенный кислород для повышенного образования биологических окислителей. По интенсивности биоокислительного потенциала данные фагоциты намного превосходят другие виды макрофагов, уступая лишь нейтрофилам [4].

Уракова Мария Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии. E-mail: urakova-mariya@yandex.ru
Тютина Руслана Рафисовна, студентка
Илаева Алия Гамилевна, студентка
Латыпова Регина Айдаровна, студентка

К настоящему времени установлено изменение врожденного и адаптивного иммунитета при нарушении центральной нервной регуляции. Выявлено изменение содержания Т-лимфоцитов, антител и других показателей адаптивной иммунной системы при алкогольном повреждении головного мозга [3]. Доказано, что макрофаги играют двойственную роль в патогенезе самой частой аутоиммунной патологии головного мозга – рассеянного склероза. Они могут оказывать нейропротекторные эффекты, но также способствуют повреждению клеток головного мозга при выделении провоспалительных цитокинов [10]. Вместе с тем, механизмы врожденной иммунной защиты легких, в том числе активности альвеолярных макрофагов, при данных патологиях изучены не достаточно.

Цель исследования: изучение функциональной активности альвеолярных макрофагов при алкогольном и аутоиммунном поражении головного мозга у крыс.

Экспериментальное исследование проведено на 44 крысах-самцах массой 180-250 грамм. Эксперимент проводился с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Алкоголизм воспроизводили путем исключения воды из питьевого рациона и предоставления крысам (n=10) для питья 20% раствора этанола [1]. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) моделировали путем подкожной инокуляции энцефалитогенной смеси с полным адъювантом Фрейнда [11]. В качестве

контроля использовалось 25 интактных животных. Спустя 16 недель (хронический алкоголизм) или 3 недели (ЭАЭ) у всех крыс путем лаважа получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС). Из клеточной взвеси, полученной после центрифугирования БАС готовили мазки методом окраски по Романовскому-Гимзе, в которых подсчитывали эндопульмональную цитограмму. Для определения поглотительной активности альвеолярных макрофагов подчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) - процент фагоцитирующих клеток, и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов фагоцитоза (дрожжей), поглощенное одной клеткой спустя 30 и 60 минут инкубации. При сопоставлении фагоцитарного числа 30-минутной и 120-минутной инкубации подчитывали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Обработка статистических данных выполнена на основе пакета прикладных компьютерных программ «Microsoft Excel 2007» и «SPSS» for Windows. Достоверность отличий изучаемых параметров между группами

оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия выборок считали статистически достоверными при уровне значимости p<0,05.

Результаты и обсуждение. В ходе экспериментальных исследований было выявлено, что моделирование алкоголизма у крыс сопровождалось увеличением количества альвеолярных макрофагов и снижением лимфоцитов, нейтрофилов по сравнению с контролем (p<0,05, табл. 1). При этом наблюдалось увеличение дегенеративных форм альвеолярных макрофагов в (р<0,05, табл. 1). По-видимому, появление дегенеративных клеток при приеме алкоголя можно объяснить тем фактом, что при данной интоксикации легкие подвергаются двоякому воздействию этанола – через центральную нервную систему и непосредственному. Доказана подверженность альвеолярных макрофагов дегенеративным изменениям при различных воздействиях [5]. Кроме того, установлено повреждающее действие алкоголя на мембраны клеток [6].

Таблица 1. Клеточный состав бронхо-альвеолярных смывов при алкоголизме и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите

Исследуемые параметры	Контроль	Алкоголизм	Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ)
макрофаги (%)	56,80±2,51	79,20±1,20*	78,22±3,40 *
в том числе дегенеративные формы (%)	0,9±0,01	5,20±0,20 *	35,19±2,50 *
лимфоциты (%)	41,20±2,55	21,30±1,00 *	21,55±1,90 *
нейтрофилы (%)	2,00±0,05	0,5±0,01 *	0,2±0,02 *

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с контрольными значениями (p<0,05)

Изучение клеточного состава БАС при ЭАЭ выявило увеличение альвеолярных макрофагов на фоне снижения лимфоцитов и нейтрофилов против контрольных значений (p<0,05, табл. 1). Наблюдалось повышение содержания дегенеративных форм альвеолярных макрофагов в 36 раз (p<0,05, табл. 1). С нашими данными, отражающими высокую степень дегенерации этих клеток, согласуются результаты клинических исследований, выявивших изменения мембранных свойств фагоцитов у больных рассеянным склерозом [7]. Изучение поглотительной

активности альвеолярных макрофагов в условиях экспериментального алкоголизма выявило снижение фагоцитарного индекса спустя 30 и 120 минут инкубации по сравнению с контролем (р<0,05, табл. 2). При этом уменьшалось число объектов фагоцитоза, поглощенное одной клеткой в течение 30 и 120 минут (р<0,05, табл. 2). Защитная роль фагоцитоза зависит от завершенности этого процесса, выявлено, что моделирование алкоголизма вызывало снижение ИЗФ у крыс (р<0,05, табл. 2).

Таблица 2. Параметры поглотительной активности альвеолярных макрофагов при моделировании алкоголизма и ЭАЭ

Исследуемые параметры	Контроль	Алкоголизм	Экспериментальный аутоиммунный энце-
			фаломиелит (ЭАЭ)
ФИ 30 мин	$32,25\pm2,05$	20,14±1,6*	65,60±4,26*
ФИ 120 мин	65,5±2,25	42, 30±3,20*	86,50±4,56*
ФЧ 30 мин	$1,80\pm0,05$	0, 86±0,03*	3,20±0,59*
ФЧ 120 мин	1,55±0,06	1,04±0,02*	3,85±0,32*
ИЗФ	$1,16\pm0,02$	0, 82±0,04*	0,83±0,05*

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контрольными значениями (р<0,05)

Учитывая, что головной мозг является одним из главных органов-мишеней при алкогольной интоксикации, прием этанола может приводить к нарушению центральной регуляции врожденного иммунитета легких [8]. Доказаны функциональные и структурные изменения при алкоголизме гиппокампа, гипоталамуса и других отделов ЦНС, участвующих в нейроиммунной регуляции организма. Установлено, что активация вышеперечисленных структур вызывает изменение неспецифической резистентности легких в эксперименте [3].

Влияние прямого влияния этанола на активность альвеолярных макрофагов включает несколько механизмов. Во-первых, показано, что хроническое употребление алкоголя уменьшает β-субъединиц гранулоцитарноколичество моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) в альвеолярных макрофагах, вызывая нарушение транскрипции фактора PU1 этих клеток. В результате наблюдается изменение клеточной адгезии, дефект FC-рецепторов фагоцитоза и снижение выработки ИЛ-12, ИЛ-18 альвеолярными макрофагами [12]. Во-вторых, этанол вызывает снижение внутриклеточного содержания цинка в макрофагах, при нормальном его сывороточном содержании. Учитывая, что цинк является важным кофактором для более, чем 300 ферментов, то его дефицит будет проявляться нарушением клеточной пролиферации, окислительно-восстановительного баланса и внутриклеточного гомеостаза [12]. В-третьих, алкоголь индуцирует уменьшение активности НАДФ-оксидазы и миелопероксидазы, что сопровождается сниженным образованием свободных кислородных радикалов [13].

Исследование фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов при ЭАЭ выявило увеличение процента фагоцитирующих клеток спустя 30 и 120 минут инкубации против контрольных значений (р<0,05, табл. 2). При этом наблюдалось повышение фагоцитарного числа после 30 и 120 минут инкубации на фоне незавершенности фагоцитоза (р<0,05, табл. 2). Наши данные сопоставимы с результатами [9], выявившими увеличение растворимой формы молекулы CD-14, являющейся маркером активации макрофагов, в плазме крови у больных с различными формами рассеянного склероза. Кроме того, известно, что оптимальное функционирование фагоцитов, как и других клеток, определяется вязкостью их мембран, которая зависит от разных факторов, в том числе, от содержания холестерина в липидном бислое. Установлено снижение уровня холестерина в клеточных мембранах моноцитов периферической крови у больных рассеянным склерозом [7]. Учитывая, что до 70% альвеолярных макрофагов происходят из циркулирующих моноцитов периферической крови, можно предположить сниженное содержание холестерина и в альвеолярных макрофагах, вызывающее нарушение их функциональных свойств.

Выводы: выявлено увеличение количества альвеолярных макрофагов в бронхоальвеолярных смывах при алкогольном и аутоиммунном поражении головного мозга. Дизрегуляторные изменения функциональной активности альвеолярных макрофагов, характеризующиеся снижением фагоцитарной активности при алкоголизме и её увеличением при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, сопровождаются незавершенным фагоцитозом, что может приводить к высокой частоте пневмоний при данных патологиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Буров, Ю.В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма / Ю.В. Буров, Н.Н. Ведерникова. – М.: Медицина, 1985. 250 с.
- 2. *Ерохин, В.В.* Клеточная биология легких в норме и при патологии / *В.В. Ерохин, Л.К. Романова.* М.: Медицина, 2000. 496 с.
- Крыжановский, Г.Н. Нейроиммунопатология. М.: Медицина, 1997. 282 с.
- Маянский, Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. 272 с.
- Мукашева, М.А. Оценка воздействия клеточной пыли на клеточные структуры легких и печени / М.А. Мукашева, Д.В. Агеев, М.А. Кинаятов // Современные проблемы экспериментальной и клинической медицины. 2009. №12. С. 56-57.
- Прокопьева, В.Д. Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты in vitro и in vivo. – Томск: Томский университет. 2004. 160 с.
- 7. *Султанова, И.В.* Физико-химические особенности клеточных мембран мононуклеарных фагоцитов при рассеянном склерозе / *И.В. Султанова, Д.Г. Халиуллина* // Медицинская иммунология. 2003. Т. 5, № 3-4. С. 271-272.
- Шорманов, С.В. Структурные изменения головного мозга человека при хронической алкогольной интоксикации / С.В. Шорманов, Н.С. Шорманова // Судебно-медицинская экспертиза. 2006. №4. С. 3-6.
- 9. Brettschneider, J. The macrophage activity marker sCD14 is increased in patients with multiple sclerosis and upregulated by interferon beta-1b / J. Brettschneider, D. Ecker, A. Bitsch, D. Bahner // J. Neuroimmunol. 2002. №133. V. 1-2. P.93-97.
- 10. *Vogel*, *D.Y*. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status / *D.Y. Vogel*, *E.J. Vereyken*, *J.E. Glim*, *P.D. Heijnen* // J. Neuroinflammation. 2013. № 4. P. 30-35.
- 11. *Li*, *Z*. Selective inhibition of CCR7(-) effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1.3 channel in a ratexperimental autoimmune encephalomyelitis model / *Z*. *Li*, *Wh*. *Liu*, *S*. *Han*, *B*.*W*. *Peng* // J. Biol. Chem. 2012. № 287. V. 35. P. 279-294.

- 12. *Janssen, W.J.* Alveolar macrophage dysfunction and chronic alcohol use. Time to think about zinc // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2013. Vol. 188, N. 6. P. 635-636.
- 13. *Yeligar, S.M.* Ethanol induces oxidative stress in alveolar macrophages via upregulation of NADPH oxidases / *S.M. Yeligar, F.L. Harris, C.M. Hart, L.A. Brown* // J. Immunol. 2012. № 188. V. 8. P. 3648-3657.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN ALCOHOLIC AND AUTOIMMUNE BRAIN LESION

© 2014 M.A Urakova, R.R. Tyutina A.G. Ilaeva, R.A. Latipova

Izhevsk State Medical Academy

In this work the functional activity of alveolar macrophages was investigated in alcoholic and autoimmine brain lesion. Absorbing cell activity was assessed by calculation of phagocytic index, phagocytic rate and phagocytosis efficiency. Increase of phagocytes amount in bronchoalveolar washing was observed in investigated pathologies. Decrease of phagocytic activity in alcohol abuse and increase of phagocytic activity in experimental autoimmune encephalomyelitis were accompanied by decrease of phagocytosis efficiency.

Key words: alveolar macrophage, alcohol syndrome, experimental autoimmune encephalomyelitis