

А.С. Трулев, И.В. Кудрявцев, П.Г. Назаров

ФАКТОРЫ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ КАК МОДУЛЯТОРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК И ФИБРОБЛАСТОВ*НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН (Санкт-Петербург)*

Исследовали влияние факторов острой фазы воспаления (очищенных анафилатоксинов C3a и C5a, пентраксина C-реактивного белка (СРБ) и агрегированного IgG (aIgG) — как аналога циркулирующих иммунных комплексов) на адгезивные взаимодействия тучных клеток (ТК) человека с фибробластами (ФБ). Использовали ТК линии НМС-1 и первичную линию ФБ крайней плоти человека. ТК или ФБ обрабатывали каждым из исследуемых белков воспаления в течение 24 ч, после чего исследовали изменение их адгезивных свойств. Адгезию клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что адгезивность ТК повышали все исследованные белки, тогда как адгезивность ФБ — только анафилатоксины. Стимуляция адгезивных свойств ТК была связана с повышением экспрессии молекул CD11b и ICAM-1.

Ключевые слова: анафилатоксины, C-реактивный белок, тучные клетки, фибробласты

FACTORS OF THE ACUTE PHASE OF INFLAMMATION AS MODULATORS OF THE INTERACTION OF MAST CELLS AND FIBROBLASTS

S.A. Trulioff, I.V. Kudryavtsev, P.G. Nazarov

Institute of Experimental Medicine, North-West Branch RAMS, St. Petersburg

We investigated the influence of factors of the acute phase of inflammation (purified anaphylatoxins C3a and C5a, pentraxin C-reactive protein (CRP), and aggregated IgG (aIgG) — as an analogue of circulating immune complexes) on the adhesive interaction of human mast cells (MC) with human fibroblasts (FB). HMC-1 MC line and primary human foreskin FB were used. MC or FB were treated with each of the studied inflammatory proteins within 24 h and then the changes in their adhesive properties were examined. Cell adhesion was assessed by flow cytometry. The results showed that all studied proteins increased MC adhesiveness, whereas FB adhesiveness was increased only by anaphylatoxins. Stimulation of the adhesive properties of the MC was associated with increased expression of CD11b and ICAM-1 molecules.

Key words: anaphylatoxins, C-reactive protein, mast cells, fibroblasts

Тучные клетки, как правило, располагаются в соединительной ткани субэпителиального пространства в коже, легких, по ходу желудочно-кишечного тракта. Они являются мультифункциональными клетками иммунной системы и играют важную роль в воспалительных и аллергических реакциях. Тучные клетки по ряду признаков близки к базофилам крови, например, они экспрессируют на своей поверхности высокоаффинный рецептор к IgE и содержат в гранулах вазоактивные вещества. Но, в отличие от базофилов и остальных клеток кровяного происхождения, они являются резидентами соединительной ткани и обычно не обнаруживаются в кровяном русле.

Тучные клетки играют важные роли в защите организма. В ответ на различные стимулы запускается процесс дегрануляции тучных клеток, что способствует запуску процессов воспаления. Стимулы для дегрануляции, кроме широко известного перекрестного связывания IgE на поверхности клеток, могут быть различны. Ими могут быть продукты системы комплемента, различные нейропептиды, антитела класса IgG, связывание TLR со своими лигандами. Тучные клетки способны синтезировать различные цитокины (TNF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8 и IL-13), липидные медиаторы, которые активируют лимфоциты и макрофаги, а также гистамин, влияющий на клетки эндотелия, увеличивающий его

адгезивность для клеток крови и способствующий повышению проницаемости сосудов.

Известно, что при многих видах хронического воспаления, а также при некоторых хронических аллергических состояниях происходит фиброзирование ткани, то есть разрастание соединительной ткани, порой даже с замещением изначальной ткани органа на соединительную. Тучные клетки всегда присутствуют в такого рода повреждениях в повышенном количестве, что приводит к мысли об их участии в патогенезе фиброза. Действительно, тучные клетки при воспалении повышают количество контактов с фибробластами, а секретируемые клетками медиаторы влияют на их активность. Например, при совместном культивировании тучных клеток и фибробластов наблюдается повышение пролиферативной активности последних и усиление синтеза фибробластами коллагена, гиалуронана. Последний, в частности, участвует в формировании отека, так как, являясь гидрофильной молекулой, обеспечивает приток воды в матрикс, с последующим увеличением объема ткани. Также тучные клетки активируют экспрессию рецепторов гистамина, серотонина, TNF на поверхности фибробластов и стимулируют выброс хемокинов.

Кроме того, адгезия тучных клеток к матриксу соединительной ткани является костимуляторным сигналом для экспрессии генов цитокинов в самих

тучных клетках, а, значит, и для дальнейшего развёртывания воспаления.

В настоящее время практически отсутствуют данные о взаимодействии тучных клеток с фибробластами на начальных этапах воспаления, в частности о роли белков острой фазы в регуляции контактов между этими клетками.

Целью работы было исследование влияния основных факторов острой фазы воспаления (анафилатоксинов C3a и C5a, пентраксина C-реактивного белка и агрегированного IgG — аналога циркулирующих иммунных комплексов) на адгезивные взаимодействия тучных клеток человека линии НМС-1 с фибробластами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

Тучные клетки линии НМС-1 были любезно предоставлены Dr. Butterfield (Mayo Clinic, USA). Клетки культивировали в среде Iscove (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), «Биолот», Россия) с добавлением 10 % обогащенной железом фетальной телячьей сыворотки («Hyclone», США), 1,2 мМ монотиглицерола («Sigma», США) и 40 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург). Клетки пересеивали каждые 3–4 дня. Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

В работе использовали первичную линию фибробластов человека, любезно предоставленную коллективом ООО «Покровский банк стволовых клеток» (Санкт-Петербург, Россия). Для культивирования клеток использовали среду DMEM (Sigma—Aldrich) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», Санкт-Петербург), 40 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Для дезинтеграции монослоя клетки дважды промывали раствором версена, затем инкубировали в смеси трипсина-версена (1 : 1, «Биолот», Санкт-Петербург) в течение нескольких минут, посев осуществляли 1 раз в 3 дня.

Исследование токсического эффекта исследуемых препаратов на клетки НМС-1

Для исследования потенциального влияния различных доз исследуемых препаратов, применяемых в экспериментах, на жизнеспособность клеток линии НМС-1 применяли методы ДНК-цитометрии. Для этого были проведены серии экспериментов *in vitro*, целью которых было выявление токсичных эффектов C3a в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ, C5a в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ а также C-реактивного белка человека (СРБ) и термоагрегированного IgG человека (aIgG) в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. Для выявления клеток, несущих гиподиплоидный набор ДНК, использовали метод окраски клеток йодистым пропидием.

При определении уровня апоптоза в лунки 96-луночного плоскостонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (1 × 10⁶ клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде, после чего добавляли 22 мкл стимулятора, в качестве негативного контроля ис-

пользовали бычий сывороточный альбумин (БСА) в финальной концентрации 100 нг/мл. Каждую пробу ставили не менее чем в трех параллелях. Инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. По завершении инкубации клетки переносили в пробирки типа «Эппендорф», объемом 1,5 мл («Sarstedt», Германия) и однократно отмывали избытком забуференного фосфатами физиологического раствора NaCl (ЗФР) (7 мин при 300 g). Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл ЗФР и добавляли 900 мкл 70 ° этанола, охлажденного до –20 °С. До проведения цитометрического анализа образцы хранили при –20 °С. Непосредственно перед анализом клетки осаждали центрифугированием (7 минут при 300 g) и переводили в 400 мкл ЗФР. После чего в образцы вносили по 4 мкл раствора йодистого пропидия (1 мг йодистого пропидия в 1 мл дистиллированной воды) и проводили окраску в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. По завершении инкубации проводили цитометрический учет на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter Inc., США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10000 событий.

Оценка интенсивности адгезии тучных клеток линии НМС-1 к монослою фибробластов человека

Оценку адгезионной активности клеток производили при помощи методов проточной цитометрии. В лунки 96-луночного планшета сеяли по 10 тыс. фибробластов и инкубировали до формирования конфлюэнтного монослоя. Затем удаляли среду, промывали лунки ЗФР и, если изучали изменение адгезивных свойств фибробластов под действием стимуляторов, вносили индукторы, разведенные в среде без ЭТС, с 1% БСА, после чего добавляли клетки линии НМС-1, предварительно окрашенные флуоресцентным витальным красителем суццинилимидным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE, «Fluka», США) в концентрации 10^{–6} М. Окраску клеток производили следующим образом: клетки собирали, отмывали раствором Хэнкса («Биолот», Санкт-Петербург), затем инкубировали в течение 10 минут (37 °С, в темноте) в растворе CFSE на ЗФР, после чего трижды отмывали центрифугированием холодным раствором Хэнкса. Если изучали влияние белков острой фазы на адгезивные свойства тучных клеток, то клетки стимулировали сутки, после чего отмывали и метили CFSE. Совместная инкубация продолжалась 30 мин, после чего лунки отмывали от неприкрепившихся клеток и производили учет реакции. Для этого после отмывки не адгезировавших клеток лунки промывали раствором версена, затем инкубировали с раствором трипсина в течение 10–15 мин. Затем клетки тщательно ресуспендировали и содержимое лунок в объеме 100 мкл переносили в микропробирки для анализа, после чего проводили учет интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter Inc.», США). Степень адгезии определяли по соотношению количества окрашенных CFSE клеток линии НМС-1 и не

окрашенных клеток линии фибробластов, считая количество последних одинаковым во всех лунках.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью лицензионной программы Microsoft Excel. Результаты цитометрического учета анализировали при помощи пакетов программ Kaluza («Beckman Coulter Inc.», США). Для статистической обработки и определения различий между независимыми группами нормально распределенных данных использовали парный t-критерий Стьюдента. Во всех экспериментах различие между контролем и опытом считали статистически достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование токсического эффекта различных исследуемых препаратов на клетки НМС-1. Для этого были проведены серии экспериментов *in vitro*, целью которых было выявление токсичных эффектов С3а в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ, С5а в финальных концентрациях 1, 10 и 100 нМ а также СРБ и аIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали БСА в финальной концентрации 100 нг/мл. Полученные данные указывают на то, что 24-часовая инкубация клеток в присутствии анафилатоксинов С3а и С5а не вызывает усиления апоптоза. Таким образом, эффекты исследуемых препаратов, полученные в остальных экспериментах, не являются следствием гибели клеток посредством апоптоза и/или некроза.

Стимуляция фибробластов анафилатоксинами С3а в концентрации 100 нМ и С5а в концентрации 10 нМ приводила к увеличению адгезии к ним интактных тучных клеток. Так, если в лунках с контрольными фибробластами было только 28 % CFSE-позитивных тучных клеток, то в стимулированных их количество увеличивалось до 52 % (С3а) или до 54 % (С5а).

Кроме того, С3а и С5а оказывали стимулирующее действие и на тучные клетки. С5а в концентрации 100 нМ вызывал достоверное усиление адгезии тучных клеток к фибробластам. С3а в концентрации 1 нМ также увеличивал число прикрепившихся тучных клеток.

Клетки линии НМС-1 реагировали на активацию С3а увеличением экспрессии CD11b, а на стимуляцию С5а помимо CD11b увеличивалась экспрессия и CD54 ($11,10 \pm 0,05$ до $19,32 \pm 1,06$, $p < 0,05$).

Наши опыты показали, что стимуляция тучных клеток СРБ и аIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл приводит к достоверному и дозозависимому увеличению интенсивности адгезии тучных клеток к монослою интактных фибробластов. Стимуляция фибробластов СРБ в концентрации 30 мкг/мл также приводила к усилению их адгезивных свойств: количество CFSE-позитивных тучных клеток возрастало до 50 %. Однако исследование фибробластов методом проточной цитометрии показало отсутствие на них Fcγ-рецепторов для

иммуноглобулинов класса IgG, тогда как именно Fcγ-рецепторы являются рецепторами для СРБ. В связи с этим мы предположили, что СРБ может связываться с компонентами внеклеточного матрикса при помощи сайтов связывания с ламинином и фибронектином, расположенными на одной стороне молекулы СРБ. А наличие на другой стороне молекулы пентраксина сайтов связывания с клеточными Fcγ-рецепторами приводило к заякориванию тучных клеток.

Чтобы проверить данное предположение мы стимулировали фибробласты СРБ (50 мкг/мл) или TNF (10 нг/мл). Затем, пометив тучные клетки CFSE, разделили их на 2 части: контрольную и клетки с заблокированными добавлением IgG Fcγ-рецепторами на поверхности. После чего провели 30-минутную совместную инкубацию двух видов тучных клеток с фибробластами и произвели учет реакции. Адгезия интактных тучных клеток к стимулированным фибробластам была выше чем к контрольным, как в случае стимуляции фибробластов СРБ, так и TNF. Тучные клетки с заблокированными Fcγ-рецепторами одинаково прикреплялись в лунках с контрольными и прединкубированными с СРБ фибробластами, тогда как адгезия таких тучных клеток к фибробластам, активированным TNF, сохранялась повышенной. Таким образом, было подтверждено предположение, что СРБ не активирует фибробласты, а является якорем для тучных клеток в матриксе соединительной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как результаты собственных исследований, так и анализ данных литературы, свидетельствуют о способности исследованных нами клеток отвечать на воздействие С3а и С5а компонентов каскада комплемента, а также на СРБ и на аIgG. Что касается клеток линии НМС-1, то для данных клеток был показан факт прямого взаимодействия С3а и С5а с поверхностью клеток [9, 10]. Взаимодействие данных лигандов со специфическими рецепторами сопровождалось повышением концентрации внутриклеточного кальция, что однозначно указывало на активацию НМС-1, причем эффект достигался уже спустя 20-30 секунд после внесения стимуляторов в культуральную среду. На клетках НМС-1 присутствуют также рецепторы к иммуноглобулину класса IgG — CD64 (высокоаффинный Fcγ-рецептор I) и CD32 (Fcγ-рецептор II), которые являются рецепторами и для СРБ.

Следующим этапом проведенного нами исследования было изучение влияния различных доз исследуемых препаратов на проапоптотическую активность клеток изучаемых линий. В литературе находится множество подтверждений токсического эффекта данных медиаторов воспаления на различные типы клеток. Так, было показано, что инкубация клеток в присутствии С5а в концентрациях свыше 1 мкМ сопровождается массовой гибелью клеток, например, тимоцитов крысы [6] или клеток нейробластомы [5]. Наши собственные

исследования показали, что применяемые нами финальные концентрации C3a (1, 10 и 100 нМ), C5a (1, 10 и 100 нМ), СРБ и aIgG (10 и 50 мкг/мл) не оказывали существенного влияния на гибель тучных клеток. Для клеток линии НМС-1 применяемые дозы стимуляторов не приводили к достоверному повышению числа клеток, несущих гиподиплоидный набор ДНК. Таким образом, эффекты, наблюдаемые в остальных тестах *in vitro*, являлись результатом прямого действия стимуляторов на клетки, а не артефактами, связанными с гибелью исследуемых клеток. Вместе с тем, в литературе имеются упоминания о роли C3a, C5a и СРБ в регуляции продвижения клеток по клеточному циклу. Так, было показано, что низкие дозы (1 и 10 нМ) C5a, но не C3a, способны вызывать пролиферацию эндотелиальных клеток НМЕС-1. Для СРБ описаны эффекты промитотической активности для лимфоцитов [2]. Однако в ходе приведенных экспериментов данный эффект компонентов каскада комплемента не исследовался.

При исследовании изменения экспрессии поверхностных антигенов клетками линии НМС-1 была показана активирующая роль в отношении увеличения числа CD11b и для C3a и для C5a. Но только C5a приводил к усилению экспрессии CD54 в этом случае.

По-видимому, увеличение уровня экспрессии адгезионных молекул на поверхности клеток в очаге воспаления является одним из универсальных свойств анафилатоксинов, так как именно этот феномен лежит в основе механизма привлечения циркулирующих клеток для эффективного развития иммунного ответа. При этом C3a и C5a одинаково эффективно воздействуют как на лейкоциты крови, так и на клетки эндотелия различной локализации [7].

При исследовании адгезии клеток к интактному монослою фибробластов препараты C3a и C5a в концентрациях 100 и 10 нМ, соответственно, достоверно усиливали адгезию НМС-1 к монослою интактных фибробластов, повышая относительное содержание тучных клеток в образцах до $52,3 \pm 3,6$ и $54,3 \pm 4,2$ %, соответственно. Тучные клетки соединительной ткани в ответ на стимуляцию анафилатоксинами повышают уровень синтеза и экскреции хемокина RANTES/CCL5, что является мощным стимулом для привлечения моноцитов, Т-лимфоцитов и базофилов в очаг развития реакции, тем самым, приводя к развитию специфического иммунного ответа в тканях [8].

Как показали наши опыты, СРБ и aIgG в концентрациях 10 и 50 мкг/мл оказывали стимулирующее действие на адгезивные свойства тучных клеток. Из литературных данных видно, что для С-реактивного белка характерно проявление провоспалительной активности [1], в частности

известно, что он усиливает моноцитарно-эндотелиальную адгезию. Увеличивает уровень экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на эндотелиальных клетках [4]. Однако известно также, что СРБ снижает количество рецепторов к фибронектину на нейтрофилах. Как нами было показано ранее, aIgG, являясь аналогом иммунных комплексов в эксперименте, также стимулирует активацию эндотелия и усиление адгезии к нему моноцитов линии ТНР-1. Кроме того, показано, что агрегация Fcγ-рецепторов на поверхности мышинных тучных клеток приводит к усилению их адгезии к фибронектину [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. — СПб.: Наука, 2001. — 423 с.
2. Назаров П.Г., Софронов Б.Н. С-реактивный белок в системе иммунорегуляции // Иммунология. — 1986. — № 4. — С. 12—18.
3. Dasty J., Hardison M.C., Metcalfe D.D. Aggregation of low affinity IgG receptors induces mast cell adherence to fibronectin // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158, N 4. — P. 1803—1809.
4. Devaraj S., Davis B., Simon S.I., Jialal I. CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fc-receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2006. — Vol. 291, N 3. — P. H1170—H1176.
5. Farkas I., Baranyi L., Liposits Z.S. Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells // Neuroscience. — 1998. — Vol. 86, N 3. — P. 903—911.
6. Guo R.F., Huber-Lang M., Wang X. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 106, N 10. — P. 1271—1280.
7. Skeie J.M., Fingert J.H., Russell S.R. Complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2010. — Vol. 51, N 10. — P. 5336—5342.
8. Venkatesha R.T., Berla Thangam E., Zaidi A.K., Ali H. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase // Mol. Immunol. — 2005. — Vol. 42, N 5. — P. 581—587.
9. Werfel T., Oppermann M., Butterfield J.H. et al. The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg) // Scand. J. Immunol. — 1996. — Vol. 44, N 1. — P. 30—36.
10. Zwirner J., Götze O., Sieber A. The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg) // Scand. J. Immunol. — 1998. — Vol. 47, N 1. — P. 19—24.

Сведения об авторах

Трулев Андрей Сергеевич — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12; тел.: +7-952-388-84-43; e-mail: trulioff@gmail.com)
Кудрявцев Игорь Владимирович — старший научный сотрудник ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, кандидат биологических наук
Назаров Петр Григорьевич — ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН руководитель лаборатории, доктор медицинских наук