

УДК 571.27

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
МАКРОФАГОВ: ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛИРОВАННОЙ
КИНЕТИЧЕСКОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ****¹Созарукова М.М., ²Проскурнина Е.В.**¹*ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова»**Российской академии наук, Москва, e-mail: s_madinam@bk.ru;*²*ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,**Москва, e-mail: proskurnina@gmail.com*

Макрофаги – клетки иннатного иммунитета, продуцирующие активные формы кислорода, которые выполняют прежде всего сигнальную функцию и участвуют в активации, поляризации и гибели макрофагов. Разработка протоколов оценки радикал-продуцирующей функции макрофагов имеет значение для изучения их физиологии в норме и при патологии. Продемонстрирована возможность использования метода кинетической хемилюминесценции для оценки радикал-продуцирующей функции культивируемых макрофагов. Первичная культура макрофагов получена из крови трех практически здоровых доноров по стандартной методике. Предложен протокол, основанный на регистрации полной кинетики хемилюминесценции, стимулированной как единичными стимулами форбол-12-миристинат-13 ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ), так и двумя последовательными стимулами в присутствии люминола. Показано, что ответ на единичные стимулы характеризуется аналогичной кинетикой и сопоставимыми амплитудами, что позволяет выбрать любой из имеющихся стимулов, а двухстадийная последовательная стимуляция ФМА + фМЛФ не имеет преимуществ перед одностадийной стимуляцией. С помощью многоканального хемилюминиметра целесообразно провести регистрацию кинетики спонтанной и стимулированной хемилюминесценции в течение не менее 450 мин. В качестве аналитического параметра может быть использована площадь под кривой хемилюминесценции и коэффициент стимуляции, равный отношению светосуммы стимулированной хемилюминесценции к светосумме спонтанного ответа.

Ключевые слова: культивируемые макрофаги, активные формы кислорода, хемилюминесценция**FUNCTIONAL ACTIVITY OF CULTURED MACROPHAGES:
APPLICATION OF STIMULATED KINETIC CHEMILUMINESCENCE****¹Sozarukova M.M., ²Proskurnina E.V.**¹*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, e-mail: s_madinam@bk.ru;*²*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, e-mail: proskurnina@gmail.com*

Macrophages are cells of innate immunity that produce reactive oxygen species, which primarily perform a signaling function and are involved in activation, and polarization, and death of macrophages. The development of protocols for assessing the radical-producing function of macrophages is important for the study of their physiology in health and disease. The potential of the method of kinetic chemiluminescence to assess the radical-producing function of cultured macrophages has been demonstrated. The primary culture of macrophages was obtained from the blood of three healthy donors using a standard technique. A protocol was proposed based on recording the complete kinetics of chemiluminescence stimulated by both single stimuli phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA) and N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), and by two sequential stimuli in the presence of luminol. It was shown that the response to single stimuli is characterized by similar kinetics and comparable amplitudes, which makes it possible to choose any of the available stimuli; and two-stage sequential stimulation with PMA + fMLF has no advantages over one-stage stimulation. Using a multichannel chemiluminometer, it is expedient to record the kinetics of spontaneous and stimulated chemiluminescence for at least 450 minutes. The area under the chemiluminescence curve and the stimulation coefficient equal to the ratio of the light sum of the stimulated chemiluminescence to the light sum of the spontaneous response can be used as an analytical parameter.

Keywords: cultured macrophages, reactive oxygen species, chemiluminescence

Стимулированные макрофаги продуцируют активные формы кислорода (АФК) за счет активации НАДФН-оксидазы, которая собирается на плазматической мембране из цитозольных белковых компонентов [1]. Помимо бактерицидного эффекта АФК участвуют в передаче сигналов макрофагов, которые контролируют дифференцировку, активацию, поляризацию и гибель моноцитов и макрофагов [2, 3]. Популяции макрофагов являются гетерогенными, что связано с их

возможностью поляризоваться в различные функциональные фенотипы в зависимости от внешних сигналов, при этом ключевое значение имеют АФК, что дает возможность воздействия на этот процесс при помощи антиоксидантов [4]. Избыточная продукция макрофагальных АФК может вызвать поражение ткани [5], при новой коронавирусной инфекции этот процесс имеет большое патогенетическое значение [6]. Таким образом, изучение радикал-продуцирующей

активности макрофагов имеет большое теоретическое и практическое значение.

Для определения уровня продукции активных форм кислорода давно используется метод хемилюминесценции в присутствии люминола [7]. В качестве стимулов макрофагов предложены форбол-12-миристан-13-ацетат [8], *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланин (фМЛФ) [9]. Макрофагальные активные формы кислорода представлены прежде всего супероксидным анион-радикалом и пероксидом водорода, а также митохондриальными АФК [10]. Хемилюминесцентные методы широко используются для оценки продукции АФК нейтрофилами. В подавляющем большинстве случаев используется одностадийная стимуляция, хотя двухстадийная стимуляция (ФМА и фМЛФ) позволяет значительно повысить чувствительность и информативность хемилюминесцентной методики [11].

Цель исследования – изучить возможности одностадийной и двухстадийной стимуляции для изучения радикал-продуцирующей функции культивированных макрофагов и предложить параметры, характеризующие указанную функцию.

Материалы и методы исследования

Получение культуры макрофагов человека. Первичная культура моноцитов-макрофагов была получена из крови трех практически здоровых доноров (Д.1, Д.2, Д.3) в возрасте 40 ± 3 лет. Кровь была отобрана из локтевой вены после 12 ч голодания в вакуумные пробирки с гепарином лития (12–30 МЕ). Форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1600 об/мин (центрифуга Beckman GRP, США) с последующим отделением плазмы. Клетки суспендировали в изотоническом фосфатном буферном растворе (рН 7,4). Лейкоцитарную фракцию выделяли в градиенте плотности фиколла (ПанЭко, плотность 1,077 г/см³), центрифугируя в течение 30 мин при 1600 об/мин. Полученные клетки трижды отмывали фосфатным буферным раствором (1600 об/мин, 10 мин) и суспендировали в среде X-Vivo 10 (Lonza, Бельгия). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. Клетки рассаживали на стекла в чашки Петри (10⁵ клеток на 1 см² поверхности) и выдерживали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха) при температуре 37 °С и 100% влажности не менее 12 ч. После удаления неадгезивированных клеток оставшиеся моноциты-макрофаги инкубировали в течение суток в среде X-Vivo 10 в CO₂-инкубаторе. Полученную клеточную культуру трехкратно промывали фосфатным буферным раство-

ром и суспендировали (10⁶ клеток в 1 мл) в растворе Хенкса (рН 7,4), содержащем 2 ммоль/л HEPES.

Хемилюминесцентный метод оценки радикал-продуцирующей функции макрофагов. Для изучения радикал-продуцирующей функции макрофагов использовали различные протоколы в присутствии люминола как активатора. № 1 – спонтанная хемилюминесценция, № 2 – хемилюминесценция, стимулированная форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА), № 3 – хемилюминесценция, стимулированная *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ), № 4 – последовательная стимуляция ФМА и фМЛФ.

Регистрацию хемилюминесценции проводили на хемилюминометре Lum-1200 («ДИСофт, Россия), позволяющем одновременно проводить анализ в 12 кюветах. В кювету, содержащую раствор Хенкса и стабилизированный HEPES (450 мкл) и люминол (конечная концентрация 45 мкМ) (все реагенты Sigma-Aldrich, США) помещали 100 мкл культуры макрофагов (100 тыс. клеток) и регистрировали спонтанную хемилюминесценцию в течение 10 мин, затем вносили 50 мкл дистиллированной воды (протокол № 1), или ФМА (50 нг/мл) (протокол № 2), или фМЛФ, (10 мкМ) (протокол № 3), или праймирующий стимул ФМА (50 нг/мл) (протокол № 4). После 15 мин инкубации в кювету № 4 вносили второй стимул фМЛФ (10 мкМ). Хемилюминограммы регистрировали не менее 450 мин. Макрофаги одного донора анализировали одновременно по четырем протоколам в трех повторях. Рассчитывали амплитуду ответа (максимальное значение хемилюминесценции) и светосумму сигнала (площадь под кривой), пропорциональную количеству АФК, продуцируемых макрофагами.

Результаты исследования и их обсуждение

Спонтанная хемилюминесценция в присутствии люминола характеризует базальную (фоновую) радикал-продуцирующую активность макрофагов, при этом свечение отражает прежде всего продукцию пероксида водорода. Хемилюминограммы приведены на рис. 1.

Из данных следует, что спонтанная хемилюминесценция развивается в течение длительного времени (более 7 ч), хемилюминограмма имеет вид кривой с максимумом, причем кинетика для разных доноров различается. Для количественной оценки этой функции целесообразно проводить интегрирование всей кривой и вычислять как общие, так и удельные (деленные на число макрофагов) показатели (табл. 1).

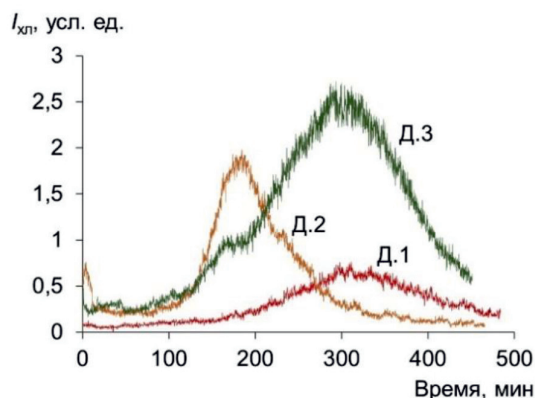


Рис. 1. Спонтанная хемилуминесценция культивируемых макрофагов трех доноров в присутствии люминола

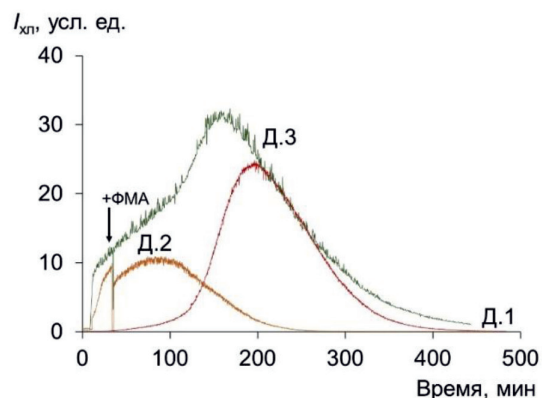


Рис. 2. ФМА-индуцированная хемилуминесценция макрофагов трех доноров; стрелкой показан момент внесения стимула

Таблица 1

Параметры, рассчитываемые из хемилуминограммы: амплитуда ответа $I_{сп}$, светосумма $S_{сп}$, рассчитанная за 450 мин, и соответствующие удельные величины $I_{сп}^*$, $S_{сп}^*$. Приведены средние из трех параллельных измерений

№ пробы	Число макрофагов в кювете, $\times 10^{-4}$, кл	$I_{сп} \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{сп} \times 10^{-3}$, имп/с	$I_{сп}^* \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{сп}^* \times 10^{-3}$, имп/с
1	10,0	0,76	8201	0,01	82,0
2	100,0	1,98	14337	0,02	14,3
3	25,0	2,72	31680	0,11	126,7

Таблица 2

Параметры, рассчитываемые из хемилуминограммы: амплитуда ответа $I_{ФМА}$, светосумма $S_{ФМА}$, рассчитанная за 450 мин, соответствующие удельные величины $I_{ФМА}^*$, $S_{ФМА}^*$, а также коэффициенты усиления по отношению к спонтанной активности. Приведены средние из трех параллельных измерений

№ пробы	Число макрофагов, $\times 10^{-4}$, кл	$I_{ФМА} \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{ФМА} \times 10^{-3}$, имп/с	$I_{ФМА}^* \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{ФМА}^* \times 10^{-3}$, имп/с	$K_{ФМА/сп} = S_{ФМА}^*/S_{сп}^*$
1	10,0	24,82	186902	2,48	18690	22,8
2	100,0	10,97	83414	0,11	834	5,8
3	25,0	32,77	365509	1,31	14620	11,5

ФМА-стимулированная хемилуминесценция так же, как и спонтанная, развивается в течение примерно такого же длительного времени, но характеризуется на 1–2 порядка большей интенсивностью (рис. 2, табл. 2).

Полный ответ на фМЛФ развивается в течение такого же времени, как и спонтанный ответ (порядка 400 мин), однако пиковое значение достигается несколько быстрее (за 100–200 мин) (рис. 3). Кинетика ответа на фМЛФ аналогична кинетике ответа на ФМА, однако интенсивность ответа в несколько раз меньше (табл. 3).

Хемилуминограммы ответа макрофагов с двойной последовательной стиму-

ляцией приведены на рис. 4. Применение второго стимула приводит не приводит к увеличению амплитуды и светосуммы ответа (табл. 4). Коэффициенты усиления ФМА и фМЛФ сопоставимы по порядку величины, а двойная стимуляция даже приводит к снижению ответа по сравнению с одностадийной стимуляцией.

К основным результатам работы можно отнести следующие факты: 1) ответ на единичные стимулы ФМА или фМЛФ характеризуется аналогичной кинетикой и сопоставимыми интенсивностями; 2) двухстадийная стимуляция не имеет преимуществ перед одностадийной.

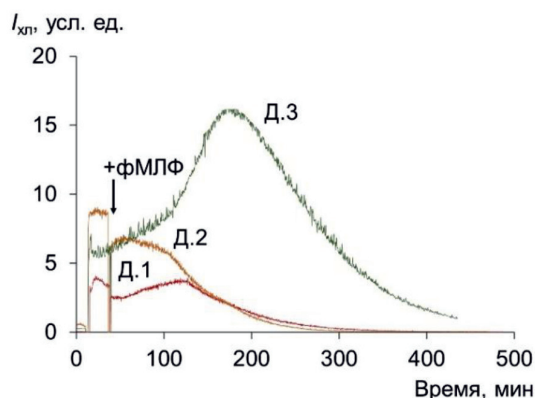


Рис. 3. ФМЛФ-индуцированная хемилюминесценция макрофагов трех доноров; стрелкой показан момент внесения стимула

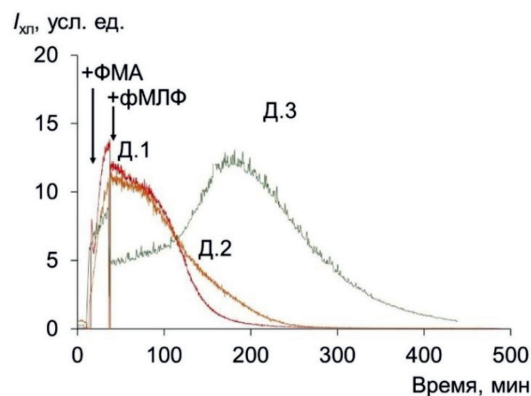


Рис. 4. Хемилюминесценция макрофагов трех доноров с двухстадийной последовательной стимуляцией ФМА+фМЛФ; стрелками показаны моменты внесения стимулов

Таблица 3

Параметры, рассчитываемые из хемилюминограммы: амплитуда ответа $I_{\text{фМЛФ}}$, светосумма $S_{\text{фМЛФ}}$, рассчитанная за 450 мин, соответствующие удельные величины $I_{\text{фМЛФ}}^*$, $S_{\text{фМЛФ}}^*$, а также коэффициенты усиления по отношению к спонтанной активности. Приведены средние из трех параллельных измерений

№ пробы	Число макрофагов, $\times 10^{-4}$, кл	$I_{\text{фМЛФ}}, \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{\text{фМЛФ}}, \times 10^{-3}$, имп/с	$I_{\text{фМЛФ}}^*, \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{\text{фМЛФ}}^*, \times 10^{-3}$, имп/с	$K_{\text{фМЛФ/сп}} = \frac{S_{\text{фМЛФ}}}{S_{\text{сп}}}$
1	10,0	4,07	37034	0,41	3703	4,5
2	100,0	9,09	57961	0,09	579	4,0
3	25,0	18,71	200292	0,75	8011	6,3

Таблица 4

Параметры, рассчитываемые из хемилюминограммы: амплитуда ответа $I_{\text{ФМА+фМЛФ}}$, светосумма $S_{\text{ФМА+фМЛФ}}$, рассчитанная за 450 мин, соответствующие удельные величины $I_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*$, $S_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*$, а также коэффициенты усиления по отношению к спонтанной активности. Приведены средние из трех параллельных измерений

№ пробы	Число макрофагов, $\times 10^{-4}$, кл	$I_{\text{ФМА+фМЛФ}}, \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{\text{ФМА+фМЛФ}}, \times 10^{-3}$, имп/с	$I_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*, \times 10^{-3}$, имп/с	$S_{\text{ФМА+фМЛФ}}^*, \times 10^{-3}$, имп/с	$K_{\text{ФМА+фМЛФ/сп}} = \frac{S_{\text{ФМА+фМЛФ}}}{S_{\text{сп}}}$
1	10,0	12,13	113114	1,18	8095	
2	100,0	11,48	74462	0,11	744	5,2
3	25,0	14,50	152069	0,58	6082	4,8

Такой отклик макрофагов отличается от ответа нейтрофилов на стимулы, где ответ на ФМА и фМЛФ характеризуется различной кинетикой, а двойная последовательная стимуляция в присутствии люминола приводила к значительному (на порядки) увеличению интенсивности ответа нейтрофилов по сравнению с единичным стимулом ФМА или фМЛФ [12]. Усиление ответа на рецепторный стимул (фМЛФ) является результатом праймирования первым стимулом ФМА, который проникает в клетку путем диффузии и стимулирует

протеинкиназный путь сборки НАДФН-оксидазы [13]. В макрофагах иные механизмы праймирования и активации [14], что приводит к различиям в ответе на стимулы и в кинетике этого ответа.

В работе для анализа активности макрофагов предложены протоколы, которые были ранее разработаны для анализа функциональной активности нейтрофилов. Одновременная реализация этих протоколов позволит провести анализ в идентичных условиях, что даст возможность адекватно сравнить радикал-продуцирующую ак-

тивность нейтрофилов и культивируемых макрофагов, полученных из одной пробы крови. В перспективе целесообразно применить описанные протоколы для изучения активности моноцитов крови в сравнении с активностью культивируемых макрофагов.

Заключение

Предложен протокол оценки радикал-продуцирующей функции культивируемых макрофагов с использованием метода кинетической хемилюминесценции с единичным стимулом (ФМА или фМЛФ) в присутствии люминола. В качестве аналитического параметра целесообразно использовать площадь под кривой хемилюминесценции, регистрируемой не менее 450 мин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, тема № 0400-2020-008.

Список литературы

1. Manea A., Manea S.A., Gan A.M., Constantin A., Fe-nyo I.M., Raicu M., Muresian H., Simionescu M. Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. Vol. 461. No. 1. P. 172–179.
2. Tavakoli S., Asmis R. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2012. Vol. 17. No. 12. P. 1785–1795.
3. Covarrubias A., Byles V., Horng T. ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res.* 2013. Vol. 23. No. 8. P. 984–985.
4. Tan H.Y., Wang N., Li S., Hong M., Wang X., Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016. Vol. 2016. P. 2795090.
5. Zaloudikova M. [NADPH-oxidase and the reactive oxygen species production by macrophages]. *Cesk Fysiol.* 2012. Vol. 61. No. 2. P. 51–56.
6. Otsuka R., Seino K.I. Macrophage activation syndrome and COVID-19. *Inflamm Regen.* 2020. Vol. 40. P. 19.
7. Allen R.C., Loose L.D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976. Vol. 69, № 1. P. 245–52.
8. Beall G.D., Repine J.E., Hoidal J.R., Rasp F.L. Chemiluminescence by human alveolar macrophages: stimulation with heat-killed bacteria or phorbol myristate acetate. *Infect Immun.* 1977. Vol. 17. No. 1. P. 117–20.
9. Holian A., Daniele R.P. Stimulation of oxygen consumption and superoxide anion production in pulmonary macrophages by N-formyl methionyl peptides. *FEBS Lett.* 1979. Vol. 108. No. 1. P. 47–50.
10. Hall C.J., Sanderson L.E., Crosier K.E., Crosier P.S. Mitochondrial metabolism, reactive oxygen species, and macrophage function-fishing for insights. *J Mol Med (Berl).* 2014. Vol. 92. No. 11. P. 1119–1128.
11. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9 (18). № 4. С. 418–425.
12. Образцов И.В., Годков М.А., Кулабухов В.В., Владимирова Г.А., Измайлов Д.Ю., Проскурнина Е.В. Ранняя диагностика ожогового сепсиса: опыт применения нового хемилюминесцентного метода анализа функциональной активности нейтрофилов с двухстадийной стимуляцией // *Общая реаниматология.* 2017. Т. XIII. № 1. С. 40–51.
13. Vogt K.L., Summers C., Chilvers E.R., Condliffe A.M. Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur J Clin Invest.* 2018. V. 48 Suppl 2. P. e12967.
14. Glass C.K., Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol.* 2016. Vol. 17. No. 1. P. 26–33.