

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»**

ДОПУСТИТЬ К ПРЕДСТАВЛЕНИЮ ГЭК
Руководитель отдела научно-
организационной деятельности и
образования, к. биол. наук Л.В. Гришина


« 08 » сентября 2020 г.

Максимова Александра Александровна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах подготовленной научно – квалификационной работы
(диссертации)


**Сравнительная характеристика различных функциональных фенотипов
макрофагов человека, генерируемых из моноцитов периферической крови, и их
влияние на фибробласты**

по основной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в
аспирантуре

Направление подготовки 30.00.00 – Фундаментальная медицина

Научная специальность: 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Научный руководитель
д-р. мед. наук


подпись Е.Я. Шевела
« 08 » сентября 2020 г.

Аспирант:


подпись А.А. Максимова

Новосибирск 2020

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Макрофаги (Мф) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, участвующих в регуляции множества процессов в организме. Характерной особенностью Мф является выраженная пластичность, которая проявляется в способности этих клеток изменять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения и подразумевает существование множества переходных состояний между двумя крайними «полосами» - классически активированными М1 и альтернативно активированными М2 Мф [Huang X. et al., 2018].

Моноциты человека, выделенные из периферической крови, *in vitro* дифференцируются в М1 и М2 Мф в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) или колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF), соответственно. Однако фенотип макрофагов зависит не только от дифференцировочного стимула, но и от факторов конкретного микроокружения. Поэтому макрофаги, дифференцированные M-CSF (про-М2) или GM-CSF (про-М1), в зависимости от стимула, который используется для поляризации *in vitro*, могут формировать различные функциональные фенотипы - М1, М2а, М2б, М2с, М2д [Jaguin M., et al. 2013, Waldo S.W. et al., 2008]. Так, М1 фенотип Мф индуцируется IFN- γ , липополисахаридом или TNF- α ; характеризуется выраженными провоспалительными свойствами, бактерицидной и противоопухолевой активностью. Макрофаги М2а фенотипа поляризуются в присутствии IL-4 и IL-13, принимают участие в индукции Th2- зависимого иммунного ответа, подавлении воспалительной реакции и развитии фиброза. М2б фенотип Мф индуцируется иммунными комплексами и агонистами TLR или IL-1 β . Основная функция М2б макрофагов заключается в регуляции «ширины» и «глубины» иммунного ответа и воспалительной реакции. Макрофаги М2с фенотипа генерируются в присутствии IL-10, TGF- β или глюкокортикостероидов (например, дексаметазона); они обладают противовоспалительными и иммунорегуляторными свойствами, а также играют важную роль в репарации, разрешении воспаления и тканевом ремоделировании. М2д фенотип Мф индуцируется под влиянием аденозина и IL-6, а также в условиях опухолевого микроокружения; они проявляют проангиогенную и иммуносупрессорную активность и способны стимулировать рост и метастазирование опухолей [Никонова А.А. и др., 2017; Wang L.-X. et al., 2018; Krzyszczyk P. et al., 2018; Tugal D. et al., 2013]. Помимо вышеперечисленных подтипов, выделяют иные субпопуляции Мф, обладающие уникальными свойствами и фенотипом, например, опухоль-ассоциированные макрофаги (tumor-associated macrophages, TAM), тканевые макрофаги, макрофаги, фенотип которых индуцируется при поглощении апоптотических клеток, Mox (мышинные макрофаги, обработанные окисленным фосфолипидом), Mhem (гем-индуцированный фенотип макрофагов, ассоциированный с кровоизлияниями). Указанные подтипы Мф, как правило, ассоциированы с различными заболеваниями, такими как атеросклероз или рак, а их характеристика значительно затруднена из-за ограниченных противоречивых данных [Krzyszczyk P. et al., 2018].

Несмотря на достаточно большое количество данных в литературе по поляризации макрофагов, в настоящий момент идентификация различных подтипов Мф у человека представляет собой сложный вопрос в силу отсутствия специфических маркеров [Beuer M. et al., 2012]. Более того, в подавляющем большинстве работ исследователи ограничиваются изучением свойств наиболее оппозиционных фенотипов Мф – М1 и М2а, либо используют для генерации Мф различные клеточные линии (U937, THP-1), хотя полученные таким образом Мф значительно отличаются по своему фенотипу и свойствам

от макрофагов человека, генерируемых из моноцитов периферической крови [Spiller K.L. et al., 2015; Shiratori H. et al., 2017; Newby A.C., 2016; Raes G. et al., 2005].

Благодаря своей гетерогенности и пластичности, т.е. способности «переключаться» с одного функционального фенотипа на другой, макрофаги могут регулировать в организме различные процессы – воспаление, репарацию, ремоделирование в различных тканях, в том числе, регуляции развития и прогрессирования фиброза [Wynn T.A., Vannella K.M., 2016]. Репарация ткани представляет собой череду последовательно сменяющихся стадий: воспаление, пролиферация и ремоделирование/реорганизация соединительной ткани. Ключевую роль на всех стадиях играют фибробласты – клетки соединительной ткани, синтезирующие белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Под влиянием различных стимулов/повреждающих факторов покоящиеся фибробласты активируются и превращаются в миофибробласты, специфическим маркером которых является альфа-гладкомышечный актин (α -SMA). Трансдифференцировка фибробластов в миофибробласты сопровождается повышением их подвижности и усилением синтеза и продукции белков ВКМ, основным элементом которого является коллаген, и особенно коллаген I типа. В течение репаративного процесса миофибробласты, наряду с продукцией белков ВКМ, секретируют цитокины, хемокины, факторы роста, а также протеазы, которые отвечают за деградацию ВКМ (в частности, матричные металлопротеазы) [Darby I.A. et al., 2014]. При хроническом повреждении/воспалении длительная персистенция миофибробластов приводит к избыточной продукции и отложению ВКМ в органах и тканях, что, в свою очередь, приводит к изменению их нормальной структуры и развитию фиброза. С другой стороны, недостаточность фиброгенеза может приводить к появлению хронически незаживающих ран [Pakshir P., Hinz B., 2018].

Фибротические процессы являются частью патогенеза множества патологических состояний, включая цирроз печени, идиопатический фиброз легких, фиброз почек. Однако на сегодняшний день не существует достаточно эффективных способов борьбы с развитием фиброза. В основном поиск методов лечения данных патологических состояний сосредоточен на попытках ингибировать продукцию миофибробластами белков ВКМ, однако в настоящий момент такой подход не позволяет достичь значимого терапевтического эффекта [Adhyatmika A. et al, 2015]. Более перспективное решение данной проблемы связывают с развитием подходов, направленных на стимуляцию клеток, ответственных за деградацию и захват компонентов ВКМ [Adhyatmika A. et al, 2015], в частности, определенных подтипов Мф.

Действительно, первоначальный взгляд на популяцию M2 Мф как клетки исключительно с профиброгенной активностью [Van Linthout S. et al, 2014] претерпел существенные изменения. Показано, что профиброгенный эффект могут оказывать M2a Мф, способные усиливать процессы отложения ВКМ и дифференцировку фибробластов в миофибробласты [Wermuth P.J., Jimenez S.A., 2015]. В то же время M2c Мф могут проявлять антифиброгенные свойства эффект и ограничивать фиброз [Sindrilaru A., Scharffetter-Kochanek K., 2013]. Однако, все эти работы по изучению про- и антифиброгенных свойств Мф были выполнены на экспериментальных животных, тогда как роль различных функциональных фенотипов Мф человека и механизмы их регуляторного влияния на фибротический процесс остаются практически неизученными.

На сегодняшний день имеются единичные работы, выполненные *in vitro* на Мф человека. В исследовании Ploeger D.T. и соавт. было показано, что факторы, продуцируемые M1 Мф, индуцируют в фибробластах продукцию матриксных металлопротеиназ, вызывающих деградацию ВКМ, тогда как кондиционные среды M2

Мф, поляризованных IL-4 и IL-13, стимулировали пролиферацию фибробластов и продукцию ими коллагена [Ploeger D.T. et al., 2013]. Glim J.E. и соавт. продемонстрировали, что кондиционная среда M2(IL-4) Мф, но не M1(IFN- γ), стимулировала увеличение α -SMA-позитивных клеток в культурах дермальных и десневых фибробластов [Glim J.E. et al., 2013]. В работе Zhu Z. и соавт. было показано, что сокультивирование дермальных фибробластов с M2(IL-4+IL-13) Мф, полученными из промоноцитарной линии THP-1, приводило к увеличению пролиферативного ответа фибробластов, уровню продукции коллагена и экспрессии α -SMA, в отличие от M1(IFN- γ) Мф [Zhu Z. et al., 2017]. Таким образом, исследования про- и антифиброгенных свойств макрофагов человека ограничены только M1 и M2a субпопуляциями. Кроме того, предполагают, что Мф человека могут принимать более сложное участие в регуляции фибротического процесса, и разные субпопуляции могут играть различную роль на определенном этапе фиброза [Hesketh M. et al., 2017]. Наконец, недостаточно исследованы механизмы реализации про/антифиброгенной активности Мф. Таким образом, изучение влияния различных субпопуляций Мф человека, получаемых из моноцитов периферической крови, на функциональную активность фибробластов представляется, несомненно, актуальным.

На основании вышеизложенного была сформулирована **цель** исследования: охарактеризовать биологические свойства различных функциональных фенотипов макрофагов человека, генерируемых из моноцитов периферической крови.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие **задачи**:

- 1) Охарактеризовать морфологию и фенотип M1, M2a, M2c, M2(LS) макрофагов
- 2) Оценить аллостимуляторную активность M1, M2a, M2c, M2(LS) макрофагов в смешанной культуре лейкоцитов (СКЛ);
- 3) Охарактеризовать способность M1, M2a, M2c, M2(LS) макрофагов к секреции цитокинов, металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, а также белков внеклеточного матрикса
- 4) Изучить влияние M1, M2a, M2c, M2(LS) макрофагов на пролиферативную активность и дифференцировку дермальных фибробластов.

Научная новизна. Впервые показано, что макрофаги M2 фенотипа отличаются от оппозитного M1 фенотипа сниженной способностью стимулировать пролиферативный ответ аллогенных Т-лимфоцитов, не зависящей от дифференцировочного (M-CSF/GM-CSF) и поляризующего (IL-4, дексаметазон, поглощение апоптотических клеток) стимула.

Установлено, что M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф характеризуются низкой продукцией провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-2) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов и высоким уровнем продукции ростовых факторов (VEGF) и хемокинов (IL-8). При этом содержание VEGF в культурах M2a(IL-4) Мф было повышенным не только по сравнению с M1(LPS), но и по сравнению с M2c(Dex) макрофагами.

Установлено влияние дифференцировочного фактора (M-CSF/GM-CSF) на величину соотношения MMP-9/TIMP-1. M-CSF-дифференцированные Мф, независимо от дальнейшей поляризации, характеризуются высоким уровнем продукции MMP-9, низким уровнем TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1, что свидетельствует об антифибротическом потенциале Мф. GM-CSF-дифференцированные Мф характеризуются сниженным соотношением MMP-9/TIMP-1, величина которого варьирует в зависимости от

поляризующего стимула (с максимумом при использовании дексаметазона и минимумом при поглощении апоптотических клеток), что указывает на профиброгенные свойства Мф.

Впервые показано, что Мф человека различных функциональных фенотипов способны продуцировать коллаген I типа, и выявлена зависимость уровня секреции коллагена от условий дифференцировки (M-CSF/GM-CSF). Продемонстрировано, что среди M-CSF-дифференцированных Мф наиболее активными продуцентами коллагена I типа являлись M2a(IL-4), среди GM-CSF-дифференцированных - M0 и M1(LPS) Мф.

Впервые продемонстрировано стимулирующее влияние растворимых факторов различных фенотипов макрофагов на пролиферативный ответ фибробластов, причем уровень стимуляции в GM-CSF-индуцированных культурах превышает таковой в M-CSF Мф, и достигает максимума в присутствии поляризованных дексаметазоном M2(c) Мф. Показано также усиление экспрессии α -SMA на фибробластах под влиянием растворимых факторов Мф, причем наибольшая стимулирующая активность в этом случае была характерна M2(LS) макрофагов.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о поляризации макрофагов человека, в частности изменении их функционального фенотипа и свойств в ответ на используемый дифференцировочный (M-CSF или GM-CSF) и поляризующий стимул (липополисахарид, IL-4, дексаметазон, поглощение апоптотических клеток). Полученные данные также свидетельствуют о сложном и неоднозначном участии всех подтипов макрофагов в регуляции фибротического процесса, опосредуемом, по-видимому, множеством механизмов, среди которых, как было показано, имеет место продукция компонентов внеклеточного матрикса. Кроме того, описаны функциональные свойства M2 макрофагов, генерируемых в условиях дефицита ростовых факторов, в частности, в контексте их влияния на дифференцировку и активацию фибробластов.

Значение работы в прикладном аспекте заключается в определении нового метода идентификации M1/M2 подтипов макрофагов, основанном на универсальном интегральном показателе этих клеток, таком как их способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т клеток в смешанной культуре лейкоцитов (аллостимуляторная активность) (Пат. РФ 2717024). Анализ операционных характеристик данного теста показал его высокую чувствительность и специфичность в отношении идентификации M1/M2 подтипа M-CSF и GM-CSF-дифференцированных макрофагов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Аллостимуляторная активность является универсальной характеристикой макрофагов, позволяющей идентифицировать оппозитные M1/M2 функциональные фенотипы макрофагов человека, генерированных *in vitro* из циркулирующих моноцитов.
2. Мф человека различных функциональных фенотипов способны продуцировать коллаген I типа, причем продукции коллагена возрастает в присутствии провоспалительного сигнала (GM-CSF).
3. Мф человека различных функциональных фенотипов через продукцию растворимых факторов стимулируют пролиферативный ответ и дифференцировку фибробластов, что свидетельствует о наличии профиброгенной активности и репаративного потенциала у всех типов макрофагов.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Объединенном иммунологическом форуме-2019 (Новосибирск, 2019 г)

Работа выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии отдела клинической иммунологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (заведующая лабораторией член-корреспондент РАН, д-р мед. наук, профессор Черных Е.Р.).

Руководитель д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клеточной иммунотерапии, Шевела Екатерина Яковлевна.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 3 печатные работы, получен патент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генерация M1, M2a и M2c подтипов макрофагов

В исследование были включены 60 условно здоровых доноров в возрасте 21-57 лет. Мононуклеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) и далее культивировали в количестве $4-5 \times 10^6$ /мл в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 (БиолоТ, Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF/ M-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. На 5-ый день в культуры добавляли соответствующие поляризующие стимулы: 10 мкг/мл LPS (E.coli 0114:B4, Sigma-Aldrich, США) - для M1; 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США) - для M2a, 50 нг/мл дексаметазона (Dex) (KRKA, Словения) - для M2c. M2(LS, Low Serum) макрофаги, генерируемые в условиях дефицита ростовых факторов, культивировали в аналогичной среде, дополненной GM-CSF (50 нг/мл) и 2% аутоплазмы в течение 7 дней; при этом время адгезии составляло 18 ч. В качестве контроля использовали неполяризованные макрофаги, культивированные в течение 7 дней в отсутствии активирующих/поляризующих стимулов (M0). По окончании срока культивирования макрофаги (Мф) получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). От каждого донора крови получали как M1(LPS), так и M2a(IL-4), M2c(Dex), M2(LS) и M0 Мф.

Линия дермальных фибробластов

Источником фибробластов служила линия дермальных фибробластов ожогового больного NAF1, которая была любезно предоставлена ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Определение фенотипа макрофагов

Для определения фенотипа, Мф окрашивали CD14-FITC, CD206-PE, и CD163-PerCP моноклональными антителами (BD PharMingen, США). Относительное содержание CD206+ и CD163+ оценивали в гейте CD14-позитивных клеток при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton-Dickinson, США).

Определение аллостимуляторной активности

Аллостимуляторную активность определяли по способности макрофагов стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов (СКЛ). Для этого МНК (1×10^5 /лунку) культивировали в 96-луночном планшете в RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной сыворотки доноров (AB(IV) группы), в отсутствие (контроль) или присутствии различных типов макрофагов (в соотношении МНК:Мф 10:1). Пролиферацию Т-клеток оценивали радиометрически на 5 день по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивации (1 мкКю/лунку). Аллостимуляторная активность Мф выражалась в виде индекса стимуляции (ИС)

(отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК).

Определение цитокинов в культурах макрофагов

Уровень продукции TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10 и IL-8 определяли в 7-суточных супернатантах культур GM-CSF-дифференцированных Мф методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Rad, Hercules, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США; чувствительность 2 пг/мл), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Уровень продукция VEGF, MMP-9 и TIMP-1 в супернатантах 7-дневных культур Мф определяли с помощью ELISA kit (все наборы R&D System, США) в соответствии с инструкцией производителя в автоматическом считывателе микропланшетов на длине волны 450 нм. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества Мф и выражали в пг/мл/10⁵ клеток-продуцентов.

Определение продукции коллагена макрофагами

Концентрацию коллагена определяли в 7-суточных супернатантах культур GM-CSF- и M-CSF-дифференцированных Мф соответствующих подтипов с помощью Human Collagen Type I Alpha 1 ELISA Kit (Wuhan Fine Biotech Co., China) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества Мф и выражали в пг/мл/10⁶ клеток-продуцентов.

Оценка пролиферации фибробластов

Пролиферативный ответ дермальных фибробластов линии NAF1 определяли радиометрическим методом по включению [3H]-тимидина. Для этого клетки линии NAF1 культивировали в 96-луночном планшете в кондиционной среде различных субпопуляций Мф, или среде DMEM/F12 (отрицательный контроль), или среде DMEM/F12 с 20 нг/мл TGF- β 1 (PeproTECH, США) (положительный контроль) в течение 24 ч, а затем заменяли на DMEM/F12 (Биолот, Россия). Пролиферацию Т-клеток оценивали на 1, 2, 3, 5 сутки по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивации (1 мкКю/лунку). Индекс стимуляции пролиферации фибробластов рассчитывали как отношение пролиферативного ответа фибробластов, обработанных кондиционной средой различных подтипов макрофагов, к уровню спонтанной пролиферации (отрицательный контроль).

Оценка дифференцировки фибробластов

Для оценки дифференцировки дермальных фибробластов линии NAF1 в миофибробласты клетки культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в кондиционной среде различных подтипов макрофагов в течение 24 ч, а затем в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) в течение 5 дней. В качестве негативного контроля использовали дермальные фибробласты, которые не обрабатывали кондиционными средами макрофагов. Для оценки внутриклеточной экспрессии альфа-гладкомышечного актина (α -SMA) фибробласты отделяли от культивируемой поверхности и обрабатывали пермеабилизирующими растворами (Transcription Factor Buffer Set, BD PharMingen, США) с последующей обработкой APC-конъюгированным α -SMA-антителами (R&D Systems, США). В качестве позитивного контроля использовали TGF- β 1-индуцированный

уровень экспрессии α -SMA. Негативным контролем служила спонтанная дифференцировка фибробластов в миофибробласты в бессывороточной среде.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc., USA). Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов (LQ–UQ, 25–75% квантили). Значимость различий сравниваемых групп оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок и U критерия Манна-Уитни; различия считались значимыми при $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Анализ операционных характеристик теста с построением характеристической кривой (receiver-operator curve, ROC) выполнялся с помощью возможностей программного обеспечения STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая и фенотипическая характеристика различных субпопуляций М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных макрофагов

Первоначально нами была исследована морфология и фенотип М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных M0, M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофагов (Мф). Как видно из рис. 1А, М-CSF-дифференцированные культуры M0, M1 и M2a и M2c Мф представляли собой преимущественно фибробластоподобные клетки и не различались между собой. Анализ экспрессии M2-ассоциированных антигенов – CD206 (как общего маркера M2) и CD163 (как маркера M2c) – в популяции CD14-позитивных клеток показал, что среди М-CSF-дифференцированных макрофагов наиболее высокое содержание CD206 и CD163-позитивных клеток (по сравнению с LPS-стимулированными M1 Мф) выявлялось в культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф (рис. 1Б). При этом наибольшее количество double-позитивных клеток регистрировалось в культурах M2c(Dex) макрофагов. Обращает на себя внимание тот факт, что M1(LPS) Мф также экспрессировали CD206 и CD163, хотя и на значительно более низком уровне.

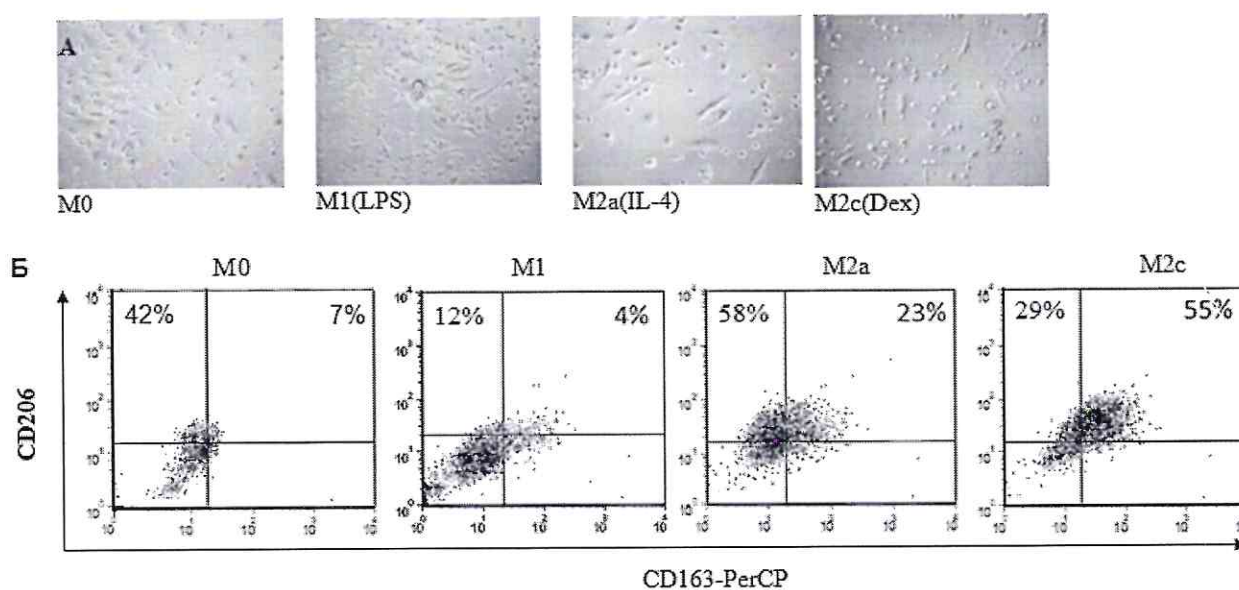


Рис.1 Морфологическая и фенотипическая характеристика М-CSF-дифференцированных M0, M1(LPS), M2a(IL-4), M2c(Dex) макрофагов. А - 7-дневные культуры M0, M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофагов (нативные препараты, увеличение x250). Б - Относительное содержание (%) CD206⁺ и CD163⁺ макрофагов M0, M1(LPS), M2a(IL-4), M2c(Dex) в гейте CD14-позитивных клеток. Представлены данные проточной цитометрии репрезентативного эксперимента.

В отличие от М-CSF-стимулированных культур, GM-CSF-дифференцированные макрофаги содержали преимущественно клетки округлой формы с небольшим количеством фибробластоподобных клеток, причем данная морфологическая картина наблюдалась во всех исследуемых субпопуляциях (см. рис. 2А). Что касается фенотипической характеристики, экспрессия M2-ассоциированных антигенов GM-CSF-дифференцированными макрофагами была схожей с М-CSF-стимулированными аналогами. Так, M2c(Dex) характеризовались высоким содержанием CD206⁺ и CD163⁺

клеток, в то время как в культурах M2a(IL-4) количество CD206⁺ и CD163⁺ Мф было ниже (рис. 2Б). Обращает на себя внимание высокая экспрессия CD206 на M1(LPS) Мф по сравнению с M-CSF-дифференцированными M1 макрофагами. Данный факт описан в литературе и объясняется способностью GM-CSF усиливать экспрессию CD206 на Мф [Lescoat A. et al., 2018; Samaniego R. et al., 2014; Rey-Giraud F. et al., 2012]. Кроме того, GM-CSF-дифференцированные M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф характеризовались относительно низким содержанием CD86-позитивных клеток (13,4% и 4%, соответственно), а также высоким содержанием клеток, экспрессирующих на своей поверхности тирозин киназу Mer (MerTK) (63% и 84%, соответственно, по сравнению с 33,5% в культурах M1(LPS), $p < 0,05$). MerTK является одним из основных рецепторов апоптотических клеток на макрофагах, который описан на CD14^{bright}CD16⁺ моноцитах человека, а также M-CSF-дифференцированных макрофагах, и особенно, на M2c Мф [Zizzo G. et al., 2012].

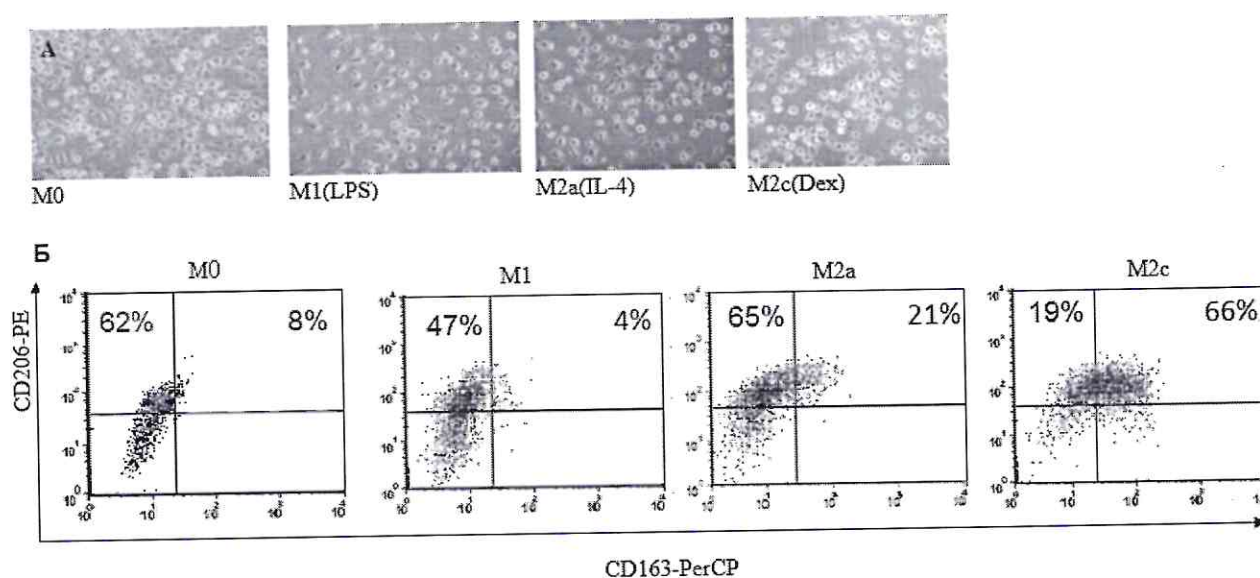


Рис.2 Морфологическая и фенотипическая характеристика GM-CSF-дифференцированных M0, M1(LPS), M2a(IL-4), M2c(Dex) макрофагов. А- 7-дневные культуры M0, M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофагов (нативные препараты, увеличение x250). Б - Относительное содержание (%) CD206⁺ и CD163⁺ макрофагов M0, M1(LPS), M2a(IL-4), M2c(Dex) в гейте CD14-позитивных клеток. Представлены данные проточной цитометрии репрезентативного эксперимента.

Сложность фенотипической характеристики Мф человека заключается, с одной стороны, в отсутствии специфического(их) маркера(ов), позволяющих однозначно определить тот или иной функциональный фенотип Мф, а с другой – в экспрессии M2-ассоциированных маркеров на M1 Мф и наоборот. Тем не менее, в настоящее время описаны поверхностные маркеры, которые – по отдельности или в комбинации - наиболее часто используются для характеристики различных субтипов Мф человека. Такими маркерами для M1 фенотипа являются MHC II класса, CD80/CD86, CD40; для M2a – CD36, CD163, CD206, CD200R и DC-SIGN (CD209); для M2c - CD206, CD163, макрофагальный рецептор с коллагеновой структурой MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), тирозинкиназа Mer (MerTK), а также SLAM (signaling lymphocytic activation molecule family member) [Никонова А.А.и др., 2017; Krzyszczyk P. et al., 2018;

Koning N. et al., 2010; Lurier E. B. et al., 2017; Zizzo G. et al., 2012]. Полученные нами данные о высоком содержании CD206+, CD163+, MerTK+ и низком содержании CD86+ клеток в культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф человека согласуются с данными литературы. В то же время одной из задач настоящего исследования стал поиск функционального параметра, позволяющего дифференцировать M1 и M2 фенотипы Мф человека. Мы предположили, что таким параметром может являться такой интегральный показатель, как аллостимуляторная активность, т.е. способность Мф стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов.

Аллостимуляторная активность M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных M0, M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофагов

Сравнительное исследование способности Мф различных функциональных фенотипов стимулировать пролиферативный ответ аллогенных Т-лимфоцитов позволило выявить ряд особенностей: 1) все исследуемые типы Мф стимулировали пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ, 2) субпопуляции различались между собой по степени выраженности эффекта. Среди M-CSF-дифференцированных Мф наиболее высокий уровень аллостимуляторной активности (4,3 расч. ед) был характерен для M1(LPS). Стимуляция IL-4 (M2a) и дексаметазоном (M2c) приводила к генерации Мф с низкой аллостимуляторной активностью, значимо отличающейся от M1(LPS) ($p=0,028$). При этом индексы стимуляции M2a(IL-4) и M2c(Dex) значимо не различались и составляли, соответственно, 1,58 и 1,65 расч. ед. Более того, они не отличались значимо от неполяризованных M0 макрофагов (рис. 3).

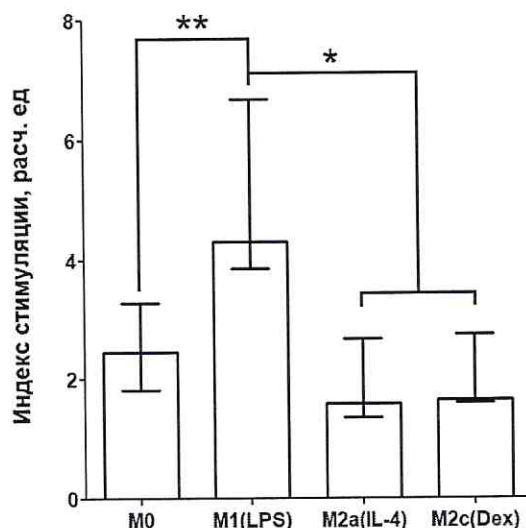


Рис. 3 Аллостимуляторная активность различных субпопуляций M-CSF-дифференцированных макрофагов. Представлены индексы стимуляции (ИС) Мф в СКЛ. Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, $n=9$.

Среди GM-CSF-дифференцированных Мф наиболее выраженный стимулирующий эффект также был характерен для M1(LPS) клеток. При этом ИС M1(LPS) варьировал от 3,6 до 57,5 расч. ед., что статистически значимо превышало значения ИС неполяризованных M0 клеток ($p=0.008$). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) клетки

отличались значимо более низкими показателями аллостимуляторной активности по сравнению с M(LPS) и M0 и усиливали пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов всего в 2,3 раза (рис. 4). Аналогичный невысокий стимулирующий эффект проявляли и M2(LS) Мф, получаемые в условиях дефицита ростовых факторов (ИС 2,3 расч. ед). Следует также отметить, что по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами, GM-CSF-дифференцированные M0 и M1(LPS) Мф характеризовались значимо более высоким уровнем стимуляции, в то время как аллостимуляторная активность M2a(IL-4) и M2c(Dex) клеток оставалась одинаково низкой вне зависимости от используемого дифференцировочного фактора (M-CSF/GM-CSF).

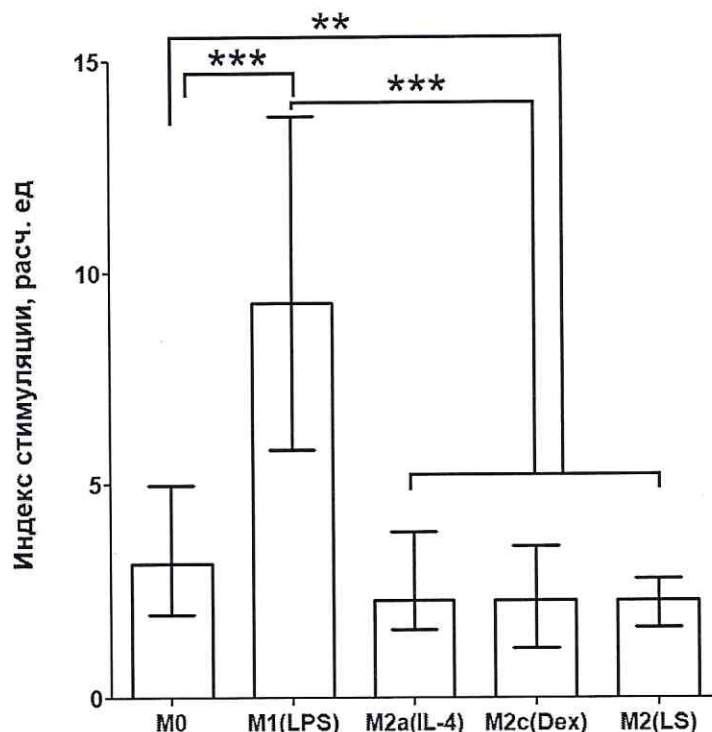


Рис. 4 Аллостимуляторная активность различных субпопуляций GM-CSF-дифференцированных макрофагов. Представлены индексы стимуляции (ИС) Мф в СКЛ. Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 50$.

Эти результаты послужили основанием для анализа операционных характеристик теста для идентификации фенотипа Мф, основанного на определении аллостимуляторной активности Мф (ИС) в СКЛ. Для этого была построена характеристическая кривая (receiver-operator curve, ROC). На рис. 5 представлена ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции M-CSF-дифференцированных M1 и M2 (M2a + M2c) макрофагов в алло-СКЛ. ROC-анализ операционных характеристик теста и построенная характеристическая ROC-кривая показали, что площадь под кривой (AUC) для данного теста составила 0.89 (95% ДИ 0,79–0,99, $p < 0,0001$), что свидетельствует о высокой точности диагностического теста. При этом определение чувствительности, специфичности и отношения правдоподобия для различных точек разделения показало, что точкой разделения, соответствующей максимальным показателям чувствительности (81%) и специфичности (89%) являлось пороговое значение $< 2,95$ расч. ед. (отношение

правдоподобия 7,3). Таким образом, низкая аллостимуляторная активность (ИС < 2.95 расч. ед.) М-CSF-дифференцированных М2 (М2а, М2с) макрофагов отличает их от М1 с высокой специфичностью (89%) и чувствительностью 81%.

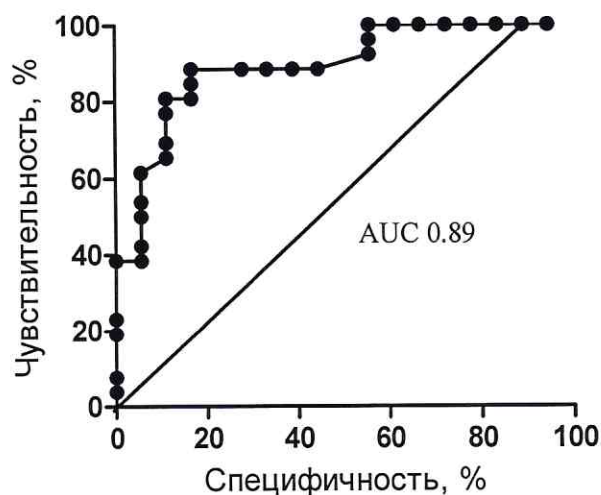


Рис. 5 ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции М1 и М2 М-CSF-дифференцированных макрофагов в СКЛ.

В свою очередь, для GM-CSF-дифференцированных М1 и М2 (М2а, М2с и М2(ЛS)) Мф анализ операционных характеристик теста показал, что площадь под характеристической ROC-кривой (AUC) составила 0.96 (95% ДИ 0,92–0,99, $p < 0,0001$), что также свидетельствует о высокой прогностической значимости теста. При этом точкой разделения, соответствующей максимальным показателям чувствительности (80,4%) и специфичности (91%) было пороговое значение < 3,7 расч. ед. (отношение правдоподобия 9,04). Соответственно, низкая аллостимуляторная активность GM-CSF-дифференцированных М2 макрофагов (ИС < 3,7 расч. ед.) отличает их от М1 Мф со специфичностью 91% и чувствительностью 80,4%.

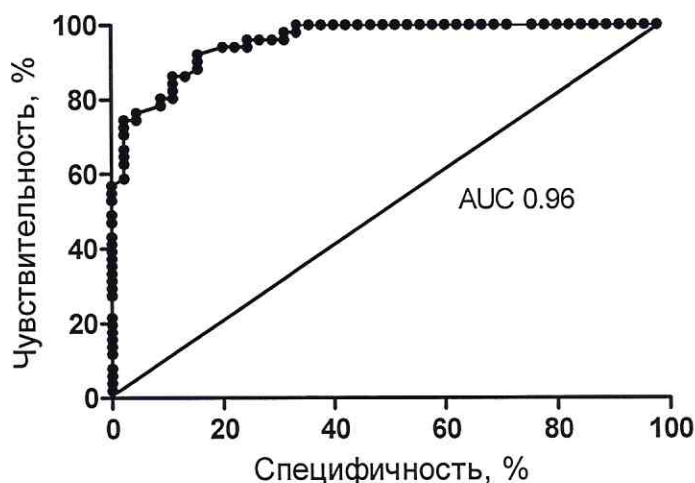


Рис. 6 ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции M1 и M2 GM-CSF-дифференцированных макрофагов в СКЛ

Таким образом, полученные ROC-кривые демонстрируют, что аллостимуляторная активность Мф может являться прогностическим признаком, позволяющим с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировать оппозитные – M1/M2 – фенотипы макрофагов [Пат. РФ 2717024 Способ идентификации функционального M1 и M2 фенотипа макрофагов человека, генерированных *in vitro* из моноцитов крови / Шевела Е.Я., Янковская А.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. № 2019118746, заявл. 17.06.2019; опубл. 17.03.2020, Бюл. № 8].

Секреторная активность

Макрофаги характеризуются широким профилем секретируемых цитокинов, хемокинов и ростовых факторов. На рис. 7 представлены данные, характеризующие концентрацию TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10, IL-8, VEGF в супернатантах 7-дневных культур M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф, дифференцированных в присутствии GM-CSF. Видно, что M1(LPS) Мф отличались высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов - TNF- α (Me 48470 пг/мл), IL-6 (588 пг/мл) и IL-2 (358 пг/мл). Наряду с ожидаемо высокой секрецией провоспалительных цитокинов, M1(LPS) Мф продуцировали также значимо более высокие количества (по сравнению с M2 Мф) IL-10 (103 пг/мл). Данная особенность M1 макрофагов может быть связана с природой используемого поляризующего стимула, так как известно, что LPS индуцирует продукцию IL-10 в Мф [Chanteux H. et al., 2007; Plas van der M.J.A. et al., 2009]. Кроме того, M1(LPS) макрофаги активно продуцировали VEGF (325 пг/мл) и хемокин IL-8 (7904 пг/мл).

По сравнению с M1(LPS), M2 Мф характеризовались выраженным снижением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее ярко это проявлялось в отношении TNF- α , содержание которого в супернатантах M2a(IL-4) и M2c(Dex) было снижено практически в 70 раз и составляло, соответственно, 733 пг/мл (vs 48470; $p=0,08$) и 701 пг/мл (vs 48470; $p=0,049$). Уровень продукции IL-6 был снижен более чем в 2 раза как в культурах M2a(IL-4) (249 vs 588 пг/мл; $p=0,03$), так и в супернатантах M2c(Dex) макрофагов (253 vs 588 пг/мл; $p=0,025$). В культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф регистрировалось также практически 5-кратное снижение продукции IL-2. Так, M2a(IL-4) Мф продуцировали IL-2 на уровне 75 пг/мл (vs 358; $p=0,03$), а M2c(Dex) - 81 пг/мл (vs 358; $p=0,049$). Наряду со сниженным уровнем TNF- α , IL-6 и IL-2, M2 макрофаги демонстрировали низкий уровень продукции IL-10. Действительно, по сравнению с M1(LPS), содержание IL-10 в культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофагов составляло 6,1 пг/мл и 4,8 пг/мл, соответственно ($p<0,05$ в обоих случаях). В противоположность снижению продукции про- и противовоспалительных цитокинов, M2a(IL-4) и M2c(Dex) макрофаги активно продуцировали VEGF и IL-8. Уровень VEGF в культурах M2a(IL-4) макрофагов более чем в 6 раз превышал таковой в супернатантах M1(LPS) Мф (2215 vs 325 пг/мл; $p=0,009$) и практически в 2 раза — в супернатантах M2c(Dex) (2215 vs 1137; $p=0,07$). Уровень продукции IL-8 был наиболее высоким в культурах M2c(Dex) Мф (12330

пг/мл), что более чем в 1,5 раза превышало содержание IL-8 в культурах M1(LPS) Мф, однако эти различия были недостоверны ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ секреторной активности двух субпопуляций M2 макрофагов, M2a(IL-4) и M2c(Dex), показал, что спектр и уровень продукции большинства исследуемых цитокинов в супернатантах указанных Мф был схожим. Действительно, M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф характеризовались низкой продукцией про- и противовоспалительных цитокинов и высоким уровнем продукции ростовых факторов и хемокинов. Примечательно при этом, что M2a(IL-4) клетки демонстрировали максимальный уровень VEGF, в то время как в культурах M2c(Dex) содержание VEGF было также повышенным по сравнению с M1(LPS) Мф, однако, не достигало уровня M2a(IL-4) ($p < 0,05$).

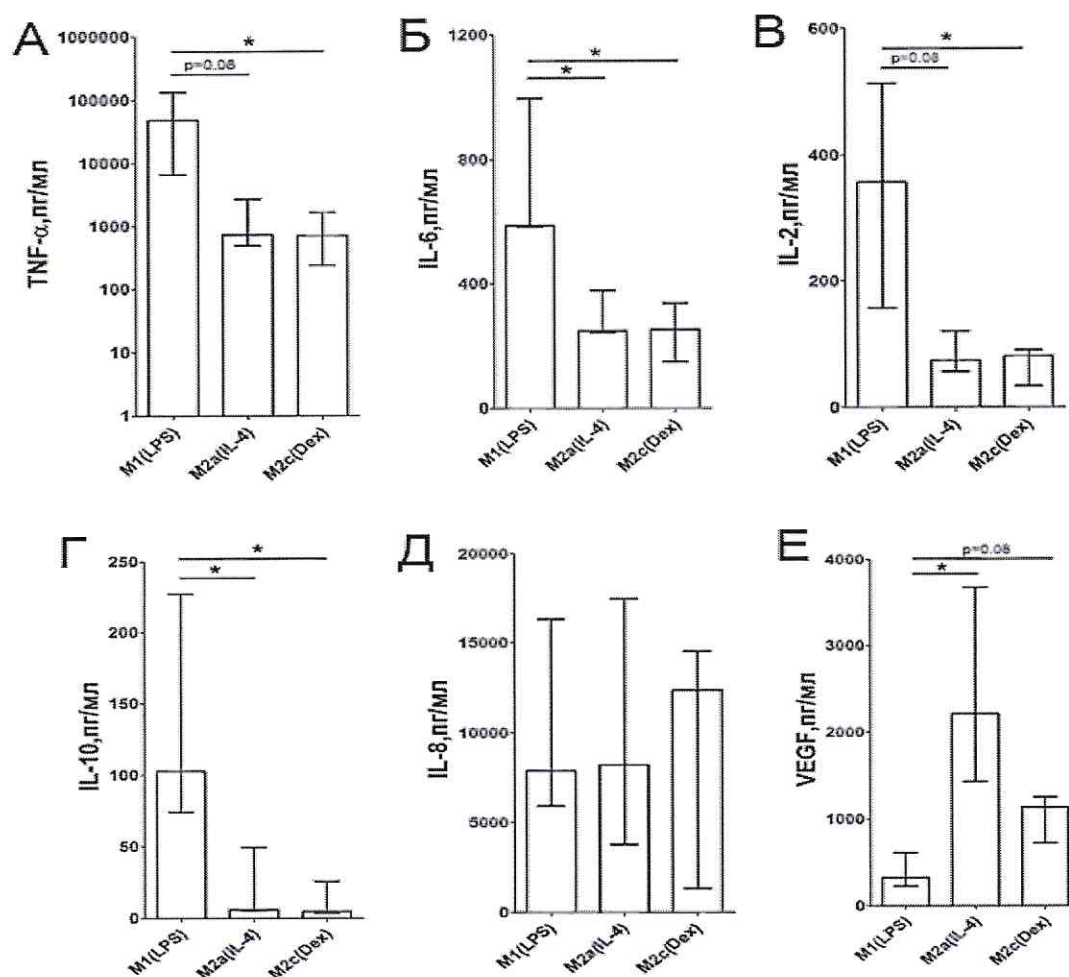


Рис. 7. Содержание цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10, IL-8, VEGF) в супернатантах 7-дневных культур различных подтипов макрофагов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, * - $p < 0,05$, $n = 5$.

Известно, что макрофаги способны принимать участие в регуляции процесса синтеза/деградации внеклеточного матрикса (ВКМ), продуцируя некоторые MMPs (MMP-1, -7, -8, -9 и -12), а также их эндогенные супрессоры, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMPs). На рис. 8 представлены данные, характеризующие концентрацию MMP-9 и TIMP-1 в 7-дневных супернатантах культур M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex). Видно, что все исследуемые субпопуляции Мф активно продуцировали MMP-9. При этом уровень MMP-9 в культурах

М-CSF-дифференцированных Мф был практически в 2 раза выше по сравнению с GM-CSF-аналогами. Среди М-CSF-дифференцированных Мф наиболее высокую MMP-продуцирующую активность проявляли M2a(IL-4) и M2c(Dex), с наибольшим содержанием MMP-9 в культурах M2a (9138 пг/мл) (см. рис. 8).

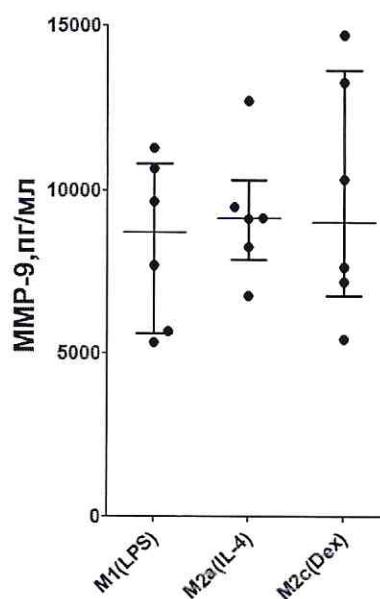


Рис. 8. Содержание MMP-9 в супернатантах 7-дневных культур М-CSF-дифференцированных макрофагов. Данные представлены в виде индивидуальных значений, медианы и интерквартильного диапазона, * - $p < 0,05$, $n = 6$.

Среди GM-CSF-дифференцированных Мф наибольшая концентрация MMP-9 выявлялось в культурах M2(LS) (6419 пг/мл), а наименьшая – в M1(LPS) (4293 пг/мл). M2a(IL-4) и M2c(Dex) характеризовались промежуточными уровнями MMP-9 в супернатантах (5529 пг/мл и 5194, соответственно) (см. рис. 9А). В свою очередь, уровень TIMP-1 был высоким в культурах M2(LS) (1709 пг/мл), промежуточным - в культурах M2a(IL-4) (670 пг/мл) и M1(LPS) Мф (620 пг/мл), и минимальным - в супернатантах культур M2c(Dex) Мф (490 пг/мл) (см. рис. 9Б).

Поскольку в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани важную роль играет баланс MMPs и TIMPs, мы проанализировали значения соотношений MMP-9/TIMP-1 для GM-CSF-дифференцированных Мф (см. рис. 9В). Оказалось, что наибольшие значения MMP-9/TIMP-1 были характерны для M2c(Dex) Мф (9,7; IQR 4,7–43,1), в то время как M1 и M2a Мф характеризовались значимо меньшими значениями (7,42 ($p = 0,045$) и 9,0 ($p = 0,045$), соответственно). Согласно данным литературы, макрофаги с M2c фенотипом принимают активное участие в разрешении фиброза, когда деградация ВКМ преобладает над его синтезом [Adhyatmika A. et al, 2015]. Следовательно, высокое соотношение MMP-9/TIMP-1 у M2c(Dex) Мф может отражать один из вероятных механизмов антифиброгенной активности этой популяции Мф. Однако для получения однозначных выводов необходимо проанализировать продукцию других MMPs и TIMPs.

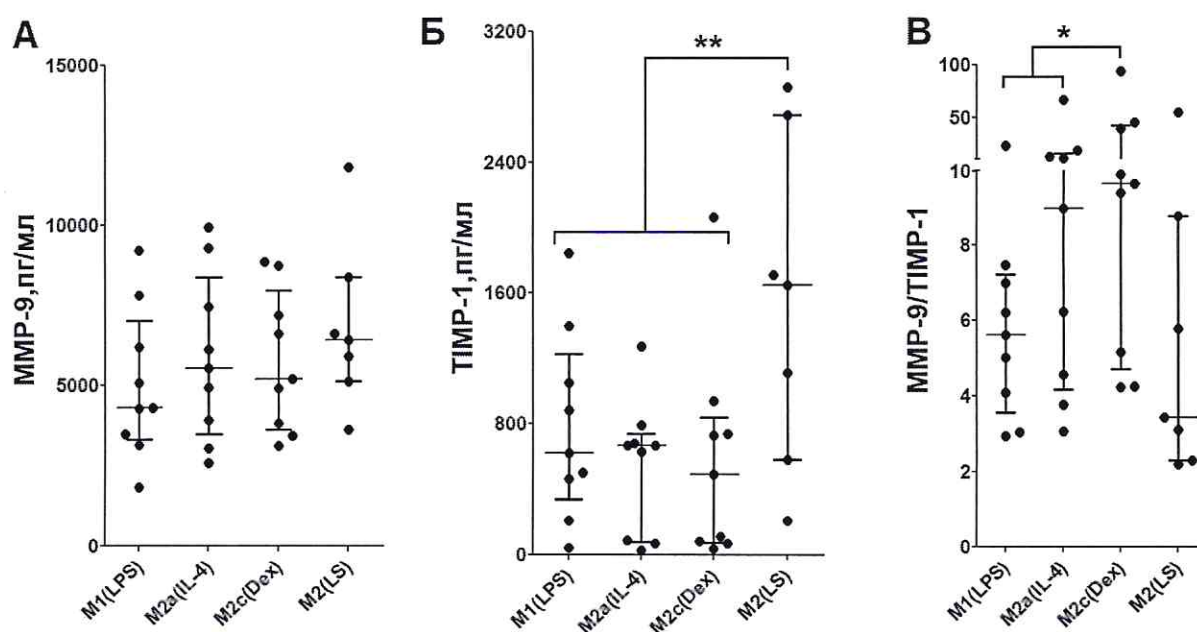


Рис. 9. Содержание MMP-9, TIMP-1 и индекса соотношения MMP-9/TIMP-1 в супернатантах 7-дневных культур GM-CSF-дифференцированных макрофагов. Данные представлены в виде индивидуальных значений, медианы и интерквартильного диапазона, * - $p < 0,05$, $n = 9$.

Ранее было показано, что Мф человека способны не только регулировать активность коллаген-продуцирующих клеток, но и самостоятельно секретировать компоненты ВКМ, такие как фибронектин, коллаген VI и VIII типа [Ucero A.C. et al., 2019; Schnoor M. et al., 2008; Weitkamp, B. et al., 1999]. Показано также, что Мф мышей и данио-рерио (zebrafish) экспрессируют мРНК коллагена I типа и способны его продуцировать [Simões F.C. et al., 2020]. Однако продуцируют ли Мф человека коллаген I типа и отличаются ли различные субпопуляции по уровню его продукции, неизвестно. Результаты оценки концентрации коллагена в супернатантах культур Мф показали, что все исследуемые подтипы были способны к продукции коллагена I типа (см. рис. 10). При этом среди M-CSF-дифференцированных Мф M2a(IL-4) характеризовались наиболее высоким уровнем продукции коллагена, который значимо отличался от уровня M1(LPS) и неполяризованных M0 Мф (4711 пг/мл vs 2276 пг/мл и 1886 пг/мл, соответственно; $p < 0,05$ в обоих случаях). Хорошо известный в литературе профиброгенный потенциал M2a Мф может быть связан в том числе с продукцией ими коллагена.

По сравнению с M-CSF, GM-CSF-дифференцированные Мф демонстрировали более высокий уровень продукции коллагена I типа. При этом самый высокий уровень коллагена был характерен для неполяризованных M0 и M1(LPS) Мф, в супернатантах которых концентрация коллагена более чем в 4 раза превышала таковую в культурах M-CSF-стимулированных M0 и M1(LPS) (9150 и 8413 пг/мл vs 1886 и 2276 пг/мл, соответственно; $p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют об усилении продукции коллагена M1 макрофагами (как поляризованными, так и неполяризованными, про-M1) в присутствии провоспалительного сигнала (GM-CSF). Следовательно, можно предположить, что на начальных стадиях фиброгенеза, когда в очаге воспаления преобладают макрофаги M1 фенотипа, профиброгенная функция Мф может быть опосредована продуцируемым ими коллагеном.

Среди M2 макрофагов наиболее выраженной коллаген-продуцирующей активностью характеризовались M2(LS), в культурах которых содержание коллагена было сопоставимо с его уровнем в супернатантах M1(LPS), значимо превышая таковой в культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) клеток. Таким образом, продукция коллагена M2 макрофагами, генерируемыми в условиях дефицита ростовых факторов, может отражать один из путей реализации репаративного потенциала этих клеток.

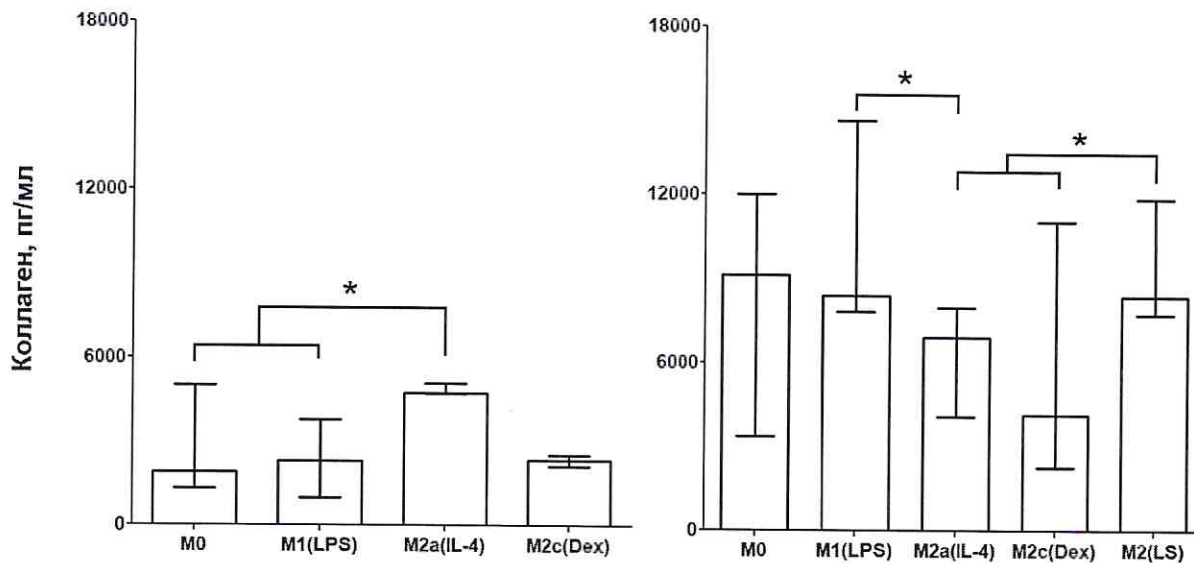


Рис. 10 Содержание коллагена I типа в супернатантах 7-дневных культур различных подтипов M-CSF- (слева) и GM-CSF- (справа) дифференцированных макрофагов. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, * - $p < 0,05$, $n = 9$.

Влияние Мф на пролиферацию дермальных фибробластов

Поскольку в основе развития фиброза лежит пролиферация фибробластов, на заключительном этапе работы мы проанализировали влияние растворимых факторов различных фенотипов макрофагов на рост и функциональную активность фибробластов (на примере линии дермальных фибробластов NAF1). Исследование влияния кондиционных сред (КС) M-CSF-дифференцированных Мф на пролиферацию клеток NAF1 представлено на рис. 11. Видно, что КС и M1, и M2 Мф оказывали умеренный стимулирующий эффект на пролиферацию клеток NAF1. При этом уровень стимуляции варьировал от 1,3 (для M1(LPS)) до 2,3 расч. ед. (для M2a(IL-4) и M2c(Dex)).

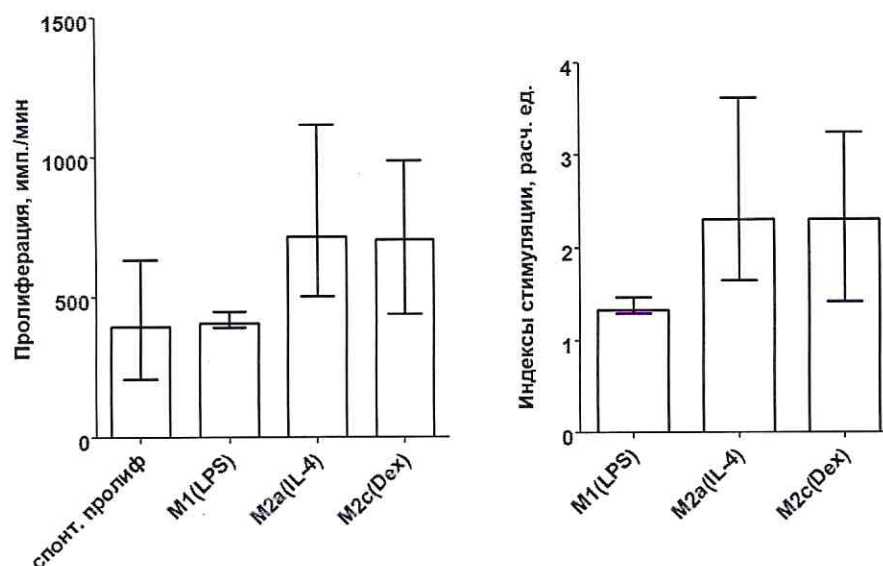


Рис. 11 Влияние кондиционных сред различных подтипов M-CSF-дифференцированных макрофагов на пролиферативный ответ клеток линии NAF1. Пролиферативная активность фибробластов представлена в виде абсолютных значений (имп/мин; слева) и индексов стимуляции (расч.ед; справа). Данные представлены в виде медиан и индеквартильных диапазонов, $n = 4$.

Обработка фибробластов кондиционными средами GM-CSF-индуцированных Мф приводила к значительно более выраженному усилению пролиферативного ответа NAF1 по сравнению с M-CSF-дифференцированными Мф. При этом индекс стимуляции варьировал от 2,4 до 9,2 расч. ед. Наиболее выраженный стимулирующий эффект оказывали КС M2c(Dex) Мф, усиливая пролиферативную активность фибробластов в 9,2 раза, что значимо превышало ИС M1(LPS) (2,4 расч. ед) и остальных подтипов (на уровне тренда). В свою очередь, КС M2a(IL-4) и M2(LS) демонстрировали усиление пролиферативного ответа фибробластов в 3,6 и 3,55 раз, соответственно (см. рис. 12).

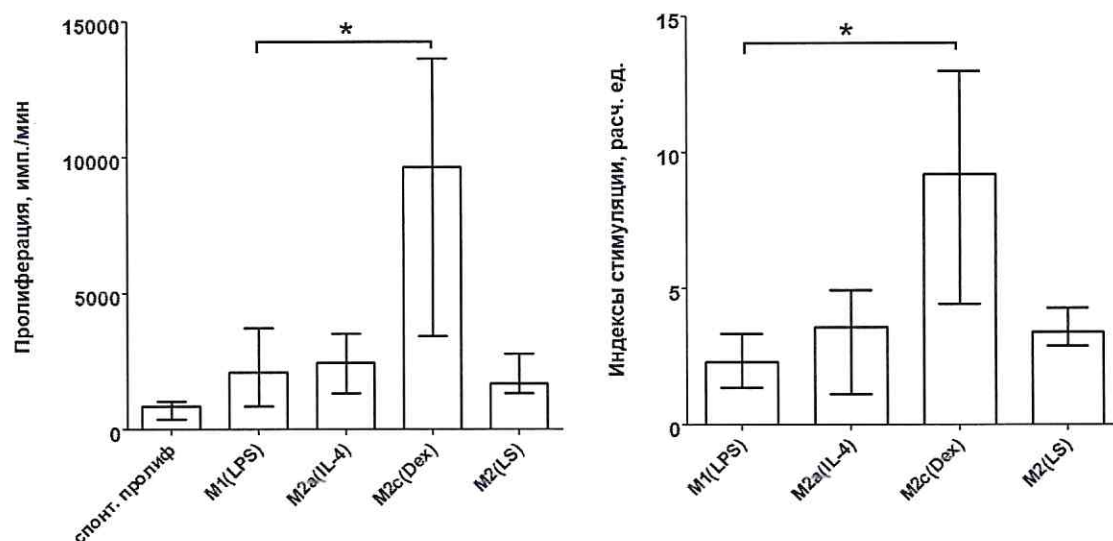


Рис. 12 Влияние кондиционных сред различных подтипов GM-CSF-дифференцированных макрофагов на пролиферативный ответ клеток линии NAF1 (абсолютные значения и индексы стимуляции). Данные представлены в виде медиан и индеквартильных диапазонов, $*p < 0,05$, $n = 9$.

Несмотря на в целом стимулирующий эффект КС GM-CSF-дифференцированных Мф на пролиферацию фибробластов, динамика стимулирующего влияния М1 и М2 (М2а и М2(ЛS)) была различной (рис. 13). Так, стимулирующий эффект КС М1(ЛPS) на пролиферацию NAF1 проявлялся уже через 24 часа, причем на сопоставимом с М2 уровне, однако к пятым суткам стимуляторные индексы существенно не изменялись. Фибробласты, обработанные КС М2 макрофагов, не только сохраняли высокий пролиферативный потенциал до пятых суток, но демонстрировали увеличение пролиферативной активности к этому сроку более чем в 2 раза по сравнению с таковым через 24 часа. При этом КС М2(ЛS), генерируемых в условиях дефицита ростовых факторов, обеспечивает более раннее усиление пролиферации NAF1- уже с 3 суток, в то время как эффект М2а(IL-4) Мф наблюдался только на 5-ые сутки. В целом, эти данные указывают на различную кинетику воздействия растворимых факторов М1 и М2 Мф, которая может быть важна для последовательной смены стадий фибротического процесса.

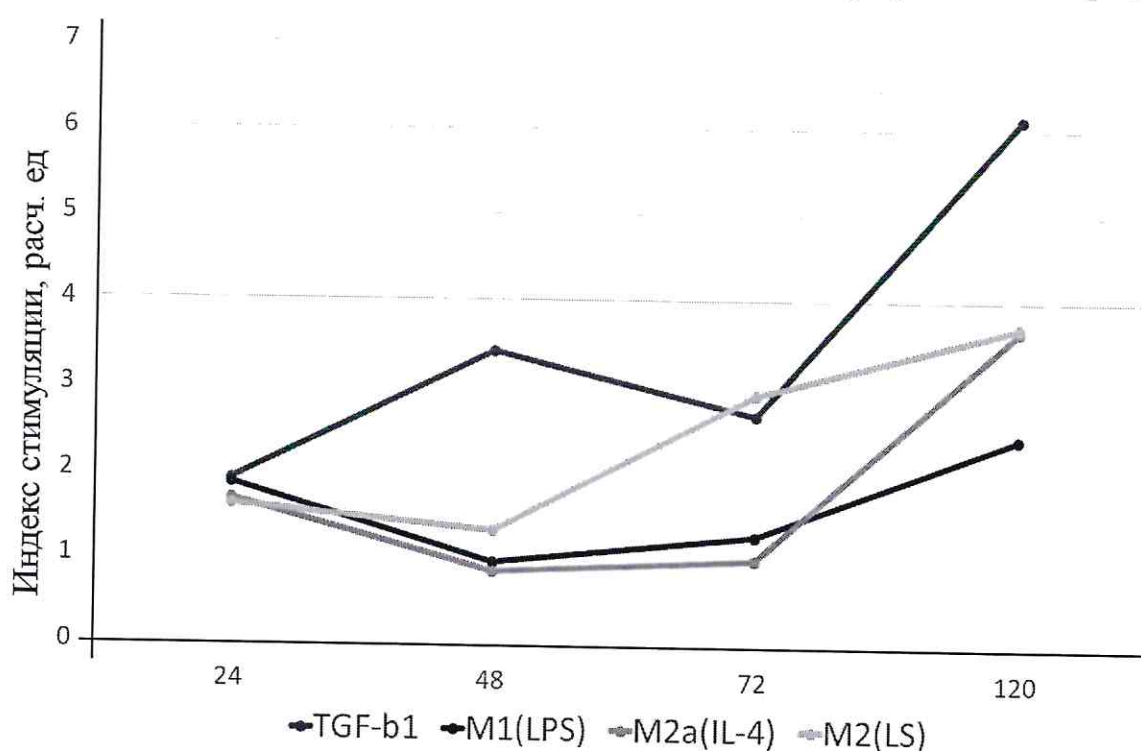


Рис. 13 Динамика влияния кондиционных сред макрофагов на пролиферацию фибробластов. Данные выражены в виде индексов стимуляции, представлены результаты единичного эксперимента.

Влияние Мф на дифференцировку дермальных фибробластов

Миофибробласты являются ключевыми клетками, участвующими в процессах репарации и фиброгенеза, благодаря контрактильным свойствам и способности активно продуцировать белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Наиболее общепринятым маркером, отражающим дифференцировку предшественников миофибробласты в активные клетки, является α -гладкомышечный актин (α -SMA), который обеспечивает сокращение межклеточного матрикса. Дифференцировка миофибробластов модулируется различными стимулами, среди которых большое значение имеют Мф и продуцируемые ими цитокины [Ploeger D. Et al., 2013; Glim J.E. et al., 2013]. Оценка влияния кондиционных сред GM-CSF-дифференцированных Мф на экспрессию фибробластами α -

гладкомышечного актина (α -SMA) показала, что растворимые факторы Мф всех исследуемых фенотипов способствовали увеличению относительного количества α -SMA-позитивных клеток в культуре (см. рис. 14). Интересно, что культивирование NAF1 св присутствии КС макрофагов, генерируемых в условии дефицита ростовых факторов - M2(LS), приводило к активации клеток на уровне TGF- β -индуцированного (позитивного) контроля, в то время как другие подтипы не достигали данного значения. Таким образом, кондиционные среды M2(LS) макрофагов могут оказывать свой репаративный эффект не только через продукцию коллагена, но и индуцируя дифференцировку фибробластов в миофибробласты.

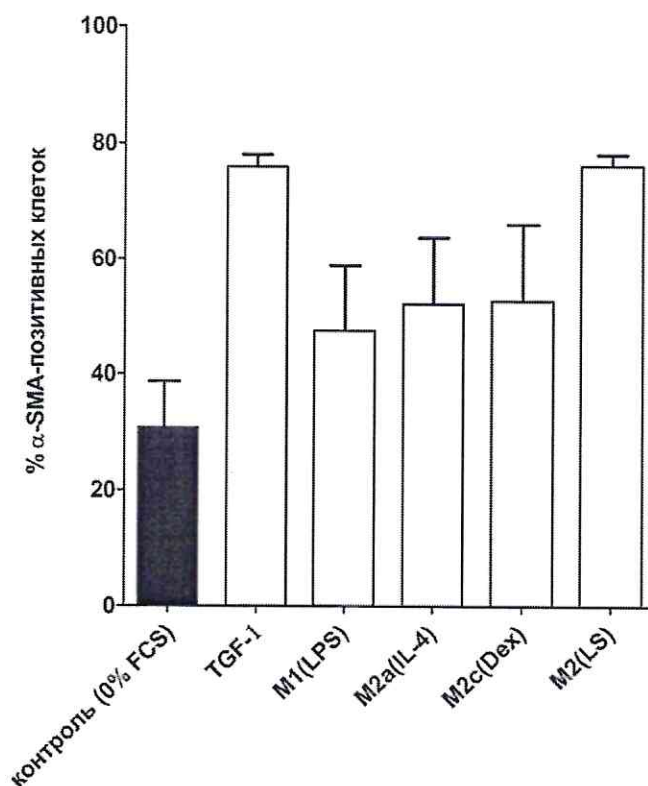


Рис. 14 Относительное содержание (%) α -SMA-позитивных клеток в культуре дермальных фибробластов после обработки кондиционными средами макрофагов. Данные представлены в виде средних значений и ошибки средней, $n=3$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что макрофаги являются крайне пластичной популяцией клеток, чьи функции в значительной мере определяются условиями дифференцировки и поляризации.

M1(LPS) клетки характеризуются активной продукцией провоспалительных факторов, относительно низким уровнем VEGF, способностью к продукции MMPs и TIMPs, а также обладают выраженной аллостимуляторной активностью, уровень которой детерминируется дифференцировочными факторами (генерируемые в присутствии GM-CSF M1 клетки обладают большей аллостимуляторной активностью, чем дифференцированные M-CSF). При этом способность к продукции коллагена M1 макрофагами также определяется условиями дифференцировки.

Поляризация макрофагов в M2a интерлейкином-4 сопровождается выраженным снижением аллостимуляторной активности, независимо от типа дифференцировочного фактора. При этом и GM- и M-CSF-дифференцированные M2a(IL-4) клетки в равной степени характеризуются выраженной продукцией IL-8, VEGF, MMP и продукцией коллагена.

В свою очередь, обработка макрофагов дексаметазоном (индукция M2c фенотипа) сопровождается выраженным снижением аллостимуляторной активности как для M-, так и для GM-CSF-индуцированных клеток. При этом, несмотря на схожий в целом профиль секреции цитокинов, хемокинов и иных биологических агентов, таких как коллаген, MMP и TIMP, данные клетки отличаются по способности оказывать влияние на пролиферативный ответ фибробластов. Так, GM-CSF-дифференцированные M2c(Dex) обладают выраженной стимулирующей активностью на пролиферацию дермальных фибробластов, M-CSF-индуцированные клетки демонстрируют лишь умеренное повышение индексов стимуляции.

M2 макрофаги, генерируемые в условиях дефицита ростовых факторов (M2(LS)), оказались уникальной популяцией макрофагов, отличной от иных исследуемых подтипов. Так, они характеризовались низкой аллостимуляторной активностью, характерной для всех макрофагов с M2 фенотипом, однако активно продуцировали коллаген на уровне GM-CSF-дифференцированных M1(LPS) макрофагов. При этом для них была также характерен максимальный уровень продукции MMP и TIMP.

В нашем исследовании было показано, что макрофаги способны оказывать влияние на активность фибробластов, стимулируя их пролиферацию и дифференцировку в миофибробласты. Важно, что этот эффект во многом определялся функциональным фенотипом клеток. Так, растворимые факторы M2c(Dex) макрофагов, дифференцированных GM-CSF, оказывали максимальный стимулирующий эффект на пролиферацию фибробластов, по сравнению с остальными типами клеток, в то время как M2(LS) макрофаги прежде всего индуцировали дифференцировку фибробластов, а на пролиферацию оказывали умеренное стимулирующее влияние. Наряду с этим, эффекты M1(LPS) на пролиферацию и дифференцировку фибробластов оказались самыми минимальными среди всех исследуемых подтипов макрофагов.

Кроме того, так как в работе во многом исследовались кондиционные среды макрофагов (их секретом и влияние на фибробласты), то можно заключить, что секреторная активность различных подтипов макрофагов, определяемая сигналами микроокружения, является важным механизмом в регуляции различных процессов в организме, включая процесс фиброгенеза.

В целом, полученные данные свидетельствуют о разностороннем влиянии дифференцировочных и поляризующих стимулов на функциональный фенотип макрофагов человека.

ВЫВОДЫ

1. Макрофаги M1 фенотипа обладают выраженной аллостимуляторной активностью, уровень которой детерминируется дифференцировочными факторами (GM-CSF>M-CSF). Поляризация в M2a и M2c фенотипы сопровождается выраженным снижением аллостимуляторной активности, независимо от типа дифференцировочного фактора (M-CSF или GM-CSF). Аллостимуляторная активность как маркер функционального фенотипа макрофагов человека может быть использована для дифференциации M1 и M2 фенотипов макрофагов человека.
2. M2a(IL-4) и M2c(Dex) фенотипы Мф характеризуются низкой продукцией провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-2) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов, высоким уровнем продукции ростовых факторов (VEGF) и хемокинов (IL-8). При этом содержание VEGF в культурах M2a(IL-4) Мф было повышенным не только по сравнению с M1(LPS), но и по сравнению с M2c(Dex) макрофагами, что указывает на репаративный потенциал M2 фенотипов GM-CSF-дифференцированных Мф.
3. M-CSF-дифференцированные Мф вне зависимости от дальнейшей поляризации характеризуются высоким уровнем продукции MMP-9, что в совокупности с низким уровнем TIMP-1 приводит к высокому соотношению MMP-9/TIMP-1 и свидетельствует об антифибротическом потенциале Мф. GM-CSF-дифференцированные Мф характеризуются более низким соотношением MMP-9/TIMP-1, величина которого варьирует в зависимости от поляризующего стимула, что указывает на профиброгенные свойства Мф.
4. Мф человека различных функциональных фенотипов способны продуцировать коллаген I типа, причем среди M-CSF-дифференцированных Мф наиболее активными продуцентами коллагена I типа являются M2a(IL-4), среди GM-CSF-дифференцированных - M0 и M1(LPS) Мф, что свидетельствует о взаимосвязи коллаген-секреторной активности и условий дифференцировки.
5. Растворимые факторы различных фенотипов макрофагов стимулируют пролиферативный ответ фибробластов, причем уровень стимуляции возрастает в условиях GM-CSF-индуцированной дифференцировки Мф и достигает максимума в присутствии поляризованных дексаметазоном M2(c) Мф, а также экспрессию α -SMA на фибробластах, что в наибольшей степени характерно для M2(LS) макрофагов, что в совокупности свидетельствует о наличии профиброгенной активности и репаративного потенциала у всех типов макрофагов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. 6. – С. 657-672.
2. Adhyatmika A., Putri K.S., Beljaars L., Melgert B.N. The Elusive Antifibrotic Macrophage // Front. Med. (Lausanne). – 2015. – №2. – С.81.
3. Beyer M. et al. High-resolution transcriptome of human macrophages //PloS one. – 2012. – Т. 7. – №. 9. – С. e45466.
4. Chanteux H. et al. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs-and Sp1-dependent mechanisms //Respiratory research. – 2007. – Т. 8. – №. 1. – С. 71.
5. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing // Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. – 2014. – №7. – С.301–311.
6. Glim J.E., Niessen F.B., Everts V., van Egmond M., Beelen R.H. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts // Immunobiology. – 2013. – Т.218. – №6. – С.924-929.
7. Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing // Int J Mol Sci. – 2017. – Т.18. – №7. – С. E1545.
8. Huang X., Li Y., Fu M., Xin H-B. Polarizing macrophages in vitro. Methods in Molecular Biology. 2018, 1784, 119-126. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_12.
9. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization Profiles of Human M-CSF-generated Macrophages and Comparison of M1-markers in Classically Activated Macrophages From GM-CSF and M-CSF Origin// Cell Immunol. – 2013. – 281(1). pp.51-61. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.010.
10. Koning N. et al. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation //Journal of innate immunity. – 2010. – Т. 2. – №. 2. – С. 195-200.
11. Krzyszczyk P. et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes //Frontiers in physiology. – 2018. – Т. 9. – С. 419.
12. Lescoat A. et al. Distinct properties of human M-CSF and GM-CSF monocyte-derived macrophages to simulate pathological lung conditions in vitro: application to systemic and inflammatory disorders with pulmonary involvement //International journal of molecular sciences. – 2018. – Т. 19. – №. 3. – С. 894.
13. Lurier E. B. et al. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing //Immunobiology. – 2017. – Т. 222. – №. 7. – С. 847-856.
14. Newby A. C. Metalloproteinase production from macrophages—a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction //Experimental physiology. – 2016. – Т. 101. – №. 11. – С. 1327-1337.

15. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication // *Matrix Biology*. – 2018. – T.68. – C.81-93.
16. Plas van der M. J. A., van Dissel J. T., Nibbering P. H. Maggot secretions skew monocyte-macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic type // *PloS one*. – 2009. – T. 4. – №. 11. – C. e8071.
17. Ploeger D.T., Hosper N.A., Schipper M., Koerts J.A., de Rond S., Bank R.A. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts // *Cell. Commun. Signal*. – 2013. – T.11. – №1. – C.29.
18. Raes G. et al. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells // *The Journal of immunology*. – 2005. – T. 174. – №. 11. – C. 6561-6562.
19. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C. H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions // *PloS one*. – 2012. – T. 7. – №. 8. – C. e42656.
20. Samaniego R. et al. Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A // *Journal of leukocyte biology*. – 2014. – T. 95. – №. 5. – C. 797-808.
21. Schnoor M. et al. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity // *The Journal of Immunology*. – 2008. – T. 180. – №. 8. – C. 5707-5719.
22. Shiratori H., Feinweber C., Luckhardt S., Linke B., Resch E., Geisslinger G., Weigert A., Parnham M.J. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro // *Mol Immunol*. – 2017. – T.88. – C.58-68.
23. Simões F. C. et al. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair // *Nature communications*. – 2020. – T. 11. – №. 1. – C. 1-17.
24. Sindrilaru A., Scharffetter-Kochanek K. Disclosure of the Culprits: Macrophages—Versatile Regulators of Wound Healing // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2013. – T.2. - №7. – C.357–368.
25. Spiller K.L., Wrona E.A., Romero-Torres S., Pallotta I., Graney P.L., Witherel C.E., Panicker L.M., Feldman R.A., Urbanska A.M., Santambrogio L., Vunjak-Novakovic G., Freytes D.O. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization // *Exp. Cell. Res*. – 2016. – T.347. – №1. – C.1-13.
26. Tugal D., Liao X., Jain M. K. Transcriptional control of macrophage polarization // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2013. – T. 33. – №. 6. – C. 1135-1144.
27. Ucero Á. C., Bakiri L., Wagner E. Collagen VI-producing macrophages mediate lung fibrosis // *European Respiratory Journal*. – 2019 – T.54. – C. PA3862.

28. Van Linthout S., Miteva K., Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells // *Cardiovasc. Res.* – 2014. – T.102. – №2. – C.258-69.
29. Waldo S. W. et al. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques // *The American journal of pathology.* – 2008. – T. 172. – №. 4. – C. 1112-1126.
30. Wang L. et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases // *Journal of leukocyte biology.* – 2019. – T. 106. – №. 2. – C. 345-358.
31. Webster N. L., Crowe S. M. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases // *Journal of leukocyte biology.* – 2006. – T. 80. – №. 5. – C. 1052-1066.
32. Wermuth P.J., Jimenez S.A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases // *Clin. Transl. Med.* – 2015. – №4. C.2.
33. Weitkamp B. et al. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque // *The FASEB journal.* – 1999. – T. 13. – №. 11. – C. 1445-1457.
34. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis // *Immunity.* – 2016. – T.44. – №3. – C.450-462.
35. Zhu Z., Ding J., Ma Z., Iwashina T., Tredget E.E. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts // *Wound Repair Regen.* – 2017. – T.25. – №3. – C.377-388.
36. Zizzo G. et al. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction // *The Journal of Immunology.* – 2012. – T. 189. – №. 7. – C. 3508-3520.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

- 1) Allostimulatory activity as a criterion of the functional phenotype of human macrophages. A. A. Yankovskaya*, E. Y. Shevela, L. V. Sakhno, M. A. Tikhonova, A. S. Dome, A. A. Ostanin, E. R. Chernykh// Human Immunology, 2019, V.80, №10, pp.890-896.
- 2) Сравнительная характеристика продукции ММР-9 и ТИМР-1 различными подтипами макрофагов. Янковская А.А., Сахно Л.В., Шевела Е.Я.// Российский иммунологический журнал, 2019, том 13(22), № 2, с.997-999.
- 3) «Продукция факторов, участвующих в регуляции фиброза, различными типами макрофагов человека». Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. // Медицинская иммунология, 2020, том 23, №4 (в печати).