

На правах рукописи

Лохонина Анастасия Вячеславовна

**Сравнительная характеристика иммунофенотипических и
функциональных свойств макрофагов эмбрионального и
костномозгового происхождения**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.м.н., доцент Т.Х. Фатхудинов

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения РФ

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Фатхудинов Тимур Хайсамудинович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, заведующий лабораторией клеточных биотехнологий ФГБОУ ВО «Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова»

Малышев Игорь Юрьевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Грачев Алексей Николаевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук (123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76 А)

Защита диссертации состоится _____ 2020 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Макрофаги тканей млекопитающих представлены несколькими популяциями, которые различаются по происхождению и функциям [Dou и др., 2020; Halдар, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2015]. Различают макрофаги костномозгового происхождения и тканевые (резидентные) макрофаги эмбрионального происхождения, которые берут начало из миелоидных предшественников желточного мешка и эмбриональной печени и заселяют ткани на различных этапах эмбриогенеза. В печени долгоживущими тканевыми макрофагами являются клетки Купфера [Halдар, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2015; Locati, Curtale, Mantovani, 2020], а макрофаги костномозгового происхождения при физиологических условиях составляют менее 10% всех макрофагов и мигрируют в печень только после повреждения и развития воспалительной реакции, в частности, после острого поражения ацетаминофеном и другими гепатотоксическими веществами [Holt, Cheng, Ju, 2008; You и др., 2013; Zigmond и др., 2014]. При резекции печени, которая не вызывает развития воспалительной реакции, миграции костномозговых макрофагов не наблюдается [Wyller и др., 2016]. Макрофаги, циркулирующие в периферической крови, и макрофаги, локализованные в соединительной ткани слизистой оболочки кишечника, имеют костномозговое происхождение. Макрофаги эмбрионального происхождения при некоторых патологических состояниях не способны выполнять функции, свойственные макрофагам костномозгового происхождения. Источник происхождения макрофагов определяет их функции, свойства и особенности регуляции ими физиологических и патологических процессов. Функциональная активность макрофагов изменяется в ответ на сигналы микроокружения. Клетки подвергаются поляризации: происходит смена функциональной программы с изменением состава поверхностных и внутриклеточных маркеров, а также спектра продуцируемых сигнальных молекул [Mantovani и др., 2004; Mantovani и др., 2013]. Согласно концепции бинарной поляризации, существуют два вида функционального состояния макрофагов: классически активированные M1-макрофаги, продуцирующие провоспалительные цитокины, активные формы кислорода и азота при воспалении и для уничтожения бактерий и опухолевых клеток; и альтернативно активированные M2-макрофаги, которые продуцируют противовоспалительные цитокины в продуктивную фазу воспаления и регулируют регенерацию, стимулируя ангиогенез и ремоделирование внеклеточного матрикса [Biswas и др., 2012; Cassetta, Cassol, Poli, 2011; Murray и др., 2014; Murray, 2017; Sica и др., 2015; Yunna и др., 2020]. Таким образом, макрофаги являются одними из главных регуляторов тканевого гомеостаза как в норме, так и при патологических процессах. Возможность активации макрофагов как *in situ*, так и *ex vivo* по провоспалительному M1 или противовоспалительному M2 пути потенциально может быть использована в терапевтических целях. Получение новых знаний об особенностях пластичности и функциональной активности гетерогенной макрофагальной популяции позволит лучше понять их роль в регуляции клеточного гомеостаза, а значит, разработать новые эффективные способы лечения воспалительных и онкологических заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

В 1972 году была сформулирована гипотеза о системе мононуклеарных фагоцитов, согласно которой макрофаги представляют собой конечную стадию дифференцировки моноцитов крови и являются производными костного мозга [Van Furth R., 1972]. Однако исследования последних десятилетий показали, что макрофаги тканей млекопитающих представлены несколькими популяциями, которые различаются по своему происхождению, механизму поддержания численности и функциям [Halder M., Murphy K.M., 2014; Hoeffel G., Ginhoux F., 2015]. К настоящему времени получен достаточно большой объем данных о пан-макрофагальных маркерах, используемых для идентификации клеток как эмбрионального (CD68) так и костномозгового (CD68, CD11b) происхождения [Holness, Simmons, 1993; Sanchez-Madrid и др., 1983; Schittenhelm, Hilkens, Morrison, 2017; Ju, C.; Tacke, F., 2016; Strauss-Ayali, Conrad, Mosser, 2007; Yona и др., 2013]. а также о маркерах функционального состояния макрофагов (CD163, CD86, CD206, Arg1, iNOs, CD80, CD200R) [Duluc и др., 2007; Röszer, 2018; Shapouri-Moghaddam и др., 2018]. Сравнительная характеристика иммунофенотипов макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения на примере клеток Купфера и моноцитов крови в литературе отсутствует. Известно, что резидентные макрофаги эмбрионального происхождения и макрофаги - производные моноцитов различаются по своими функциональным возможностям и роли в репаративных процессах [Gundra *et al.*, 2014; Guilliams and Scott, 2017]. Макрофаги костномозгового происхождения синтезируют преимущественно провоспалительные цитокины, тогда как резидентные макрофаги - факторы, регулирующие гомеостаз органа в норме и в процессе регенерации, что подтверждено на моделях воспалительных процессов [You и др., 2013; Zigmond и др., 2014; Beattie и др., 2016]. Описан широкий спектр экспрессируемых генов и секретируемых сигнальных молекул, однако эти данные противоречивы. Известно, что макрофаги из разных источников происхождения различаются способностью продуцировать про- или противовоспалительные цитокины, в то время как о чувствительности к разным факторам микроокружения макрофагов из разных генераций на сегодняшний день в литературе нет единого мнения [Lee и др., 2012; Scott и др., 2016; Guilliams and Scott, 2017; T'Jonck, Guilliams and Bonnardel, 2018]. Феномен пластичности макрофагов - возможность их активации как *in situ*, так и *ex vivo* с образованием провоспалительных M1 макрофагов или противовоспалительных M2 макрофагов [Murray, Wynn, 2011a] детально описан в литературе и не вызывает сомнения [Bain и др., 2013; Rivollier и др., 2012; Ju, Tacke, 2016; Martinez, Gordon, 2014a]. В публикациях, посвященных получению *in vitro* модели активированных клеток, есть данные об M0-макрофагах - интактных клетках, которые получают при культивировании без добавления факторов активации поляризации. С точки зрения как фундаментальной биологии, так и практической медицины эта возможность представляет огромный интерес [Murray, Wynn, 2011a]. Макрофаги рассматривают как перспективный терапевтический инструмент регуляции клеточного гомеостаза при воспалительных и онкологических заболеваниях человека [Murray, Wynn, 2011b] [Ju, Tacke, 2016; Martinez, Gordon, 2014b]. При этом

функциональные различия макрофагов разных генераций изучены недостаточно. Данные о том, как именно соотносятся макрофаги из разных источников происхождения (эмбриональные и костномозговые) с классификацией по функциональным свойствам (M1 или M2) в литературе нам не встретились. Отсутствие сравнительного исследования молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик макрофагов разного происхождения при полярных функциональных состояниях (M1 и M2) во многом ограничивает использования моноцитарно-макрофагальной системы в терапии различных болезней.

Цель работы - сравнительное исследование молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных особенностей макрофагов эмбрионального происхождения на примере тканевых резидентных макрофагов печени (клеток Купфера) и макрофагов костномозгового происхождения – производных моноцитов крови.

Задачи исследования

1. Получение изолированных популяций макрофагов эмбрионального происхождения из печени и костномозгового происхождения из крови крысы.
2. Сравнительная характеристика иммунофенотипа интактных (M0) и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения по пан-макрофагальным маркерам (CD11b, CD68) и маркерам функционального состояния (CD163, CD86, CD206, Arg1, iNOs).
3. Исследование ультраструктурных особенностей интактных (M0) и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.
4. Оценка уровня экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление (*IL1 β* , *IL4*, *TNF α* , *IL6*, *IL12 α* , *IL10*, *IL13*, *IL18*, iNOs, Arg1, *IL12 β* , *IL23*, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, CD68), и полуколичественный анализ секреции белков (TNF α , IL1 β , IL6, IL10) в кондиционированной среде интактных (M0) и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути клеток Купфера и макрофагов моноцитарного происхождения.
5. Исследование фагоцитарной и пролиферативной активности интактных (M0) и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.

Научная новизна

Интактные (M0) макрофаги костномозгового происхождения характеризуются высокой экспрессией маркеров M1-активации – мембранного белка костимулятора Т-лимфоцитов CD86 и индуцируемой синтазы оксида азота iNOs, эмбриональные макрофаги - маркера M2-активации – маннозного рецептора CD206.

Под влиянием активирующих факторов фенотип двух популяций макрофагов изменяется сходным образом: M1-индуцирующие факторы (LPS, IFN- γ) усиливают синтез iNOs, M2 (IL4, IL10, IL13) – повышение экспрессии аргиназы Arg1. Для

макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения характерен разный паттерн экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление. Интактные и активированные клетки Купфера вне зависимости от направления поляризации экспрессируют гены противовоспалительных цитокинов *Il4*, *Il10*, *Il13*, *Arg1*, макрофаги костномозгового происхождения в тех же условиях на более высоком уровне по сравнению с эмбриональными экспрессируют гены провоспалительных цитокинов *Il1 β* , *Il12a*, *TNF α* , *iNOs*. На *in vitro* модели поляризации показано, что макрофаги костномозгового происхождения обладают большей чувствительностью к интерлейкинам – IL4, IL10 и к ЛПС по сравнению с клетками Купфера.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан воспроизводимый метод получения гомогенных по пан-макрофагальным маркерам популяций клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения, позволяющий получить стабильные и жизнеспособные культуры, отличающиеся по фенотипу, спектру экспрессируемых генов и секретируемых сигнальных молекул. На *in vitro* модели продемонстрирована способность макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения к активации по провоспалительному M1 и противовоспалительному M2 пути. Обнаружен ряд особенностей морфологии, иммунофенотипа, экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление, секреции сигнальных молекул и других свойств этих клеток разного происхождения и функционального статуса (M1 и M2). Практический интерес представляют выявленные особенности функциональной пластичности макрофагов, которые целесообразно использовать при их активации как *in situ*, так и *ex vivo* по провоспалительному или противовоспалительному путям для применения в качестве терапевтического инструмента в регуляции клеточного гомеостаза при лечении воспалительных и онкологических заболеваний человека. В связи с этим расширение представлений о различиях нативных и поляризованных макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения позволит рассматривать их как потенциальные терапевтические мишени для регуляции воспаления, регенерации и канцерогенеза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Интактные (M0) макрофаги разного происхождения отличаются по иммунофенотипу и функциональным свойствам: костномозговые макрофаги характеризуются провоспалительными свойствами, эмбриональные – противовоспалительными. Иммунофенотип и функциональные свойства макрофагов динамически изменяются в зависимости от условий их микроокружения.

2. Поляризация макрофагов из разных источников происхождения в направлении M1- или M2 фенотипа сопровождается сменой функциональной программы клеток, состава поверхностных и внутриклеточных маркеров, а также спектра продуцируемых сигнальных молекул и экспрессируемых генов.

3. Эмбриональные макрофаги обладают большей чувствительностью к факторам нормального микроокружения, что позволяет им более эффективно регулировать тканевой гомеостаз в норме, в то время как реакция костномозговых макрофагов более выражена в воспалительном микроокружении?

Методология и методы исследования заключаются в комплексном системном анализе отечественной и зарубежной научной литературы в области изучения моноцитарно-макрофагальной системы, её роли в гомеостазе в норме и патологии, а также в области клеточных технологий, иммунологии, гистологии, цитологии, онтогенеза и регенеративной медицины. В работе использованы следующие методы: изолирование и культивирование клеток млекопитающих, иммуноцитохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая, флуоресцентная и трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, ПЦР-РВ, статистический анализ.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования и сопоставлении их с актуальными данными литературы.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации доложены на Всероссийской научно-практической конференции "Перспективы развития технологий регенеративной медицины» (Оренбург, 2018), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018), международном конгрессе The 43-rd FEBS Congress (Прага, 2018), всероссийской конференции с международным участием «Клинические и теоретические аспекты современной медицины – 2018» (Москва, 2018), IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), IV Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019), международном конгрессе FEBS Congress (Краков, 2019), Всероссийской научной конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины – 2019» (Москва, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, а также 6 материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (186 работ в т.ч. 4 отечественных и 182 зарубежных). Диссертация содержит 46 рисунков и 6 таблиц.

Внедрение результатов работы. Основные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология согласно пункту 6.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 185 самцах крыс аутбредного стока Вистар массой тела 250-280 г, полученных из питомника Филиал ИБХ РАН (г. Пущино). Животных содержали при естественном освещении, температуре 20-22°C и относительной влажности воздуха 60-70%. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.Н081.В00113, ГОСТ Р50258-92). Содержание животных и эксперименты выполнены в соответствии Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение исследования получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИМЧ», протокол №20 от 12 марта 2019 года.

Выделение клеток Купфера из печени крысы. Животным под эфирным наркозом проводили перфузию печени, орган извлекали, отмывали, удаляли оболочки и крупные сосуды, измельчали и инкубировали в 0,05% растворе коллагеназы I и IV типов (ПанЭко). Суспензию фильтровали и отмывали от ферментов. Отделяли непаренхиматозные клетки от паренхиматозных центрифугированием при 50g, затем с помощью градиентного центрифугирования (400g, 30 мин., 20°C) получали фракцию клеток Купфера [Zeng и др., 2013; Zhang и др., 2016]. Определяли количество клеток и оценивали их жизнеспособность с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad), далее помещали в питательную среду для дальнейшего культивирования.

Выделение моноцитов/макрофагов из периферической крови крысы. Проводили забор периферической крови у тех же животных, из которых были выделены и макрофаги печени. Методом градиентного центрифугирования (400g 30 минут 20°C) на препарате Фиколл (ПанЭко) получали фракцию моноклеарных клеток [Jaatinen, Laine, 2007]. Клетки отмывали, определяли их количество и оценивали жизнеспособность, далее помещали в питательную среду для дальнейшего культивирования.

Культивирование клеток. Клетки культивировали в условиях CO²-инкубатора (37°C, 5% CO²) в среде RPMI (ПанЭко), содержащей 10% эмбриональной телячьей

сыворотки (РАА Lab.), 1% пенициллина- стрептомицина (ПанЭко). На вторые сутки из культуры удаляли клетки, не прикрепившиеся к пластику. Частичную замену культуральной среды проводили на 4 и 7 сутки.

Активация клеток *in vitro*. Интактные культуры клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения активировали с помощью коктейлей факторов в направлении провоспалительного М1-фенотипа (М1-макрофаги) и противовоспалительного М2-фенотипа (М2-макрофаги). *In vitro* модель М1 макрофагов получали путем добавления в М0 культуру гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF (Cloud-CloneCorp) на этапе преактивации на 2-6 сутки и липополисахарида (Sigma) с IFN- γ (Cloud-CloneCorp) на 7 сутки культивирования. Для активации клеток по М2-фенотипу использовали колониестимулирующий фактор макрофагов M-CSF (Cloud-CloneCorp) на этапе преактивации и смесь интерлейкинов IL4, IL10 и IL13 (Cloud-CloneCorp) на 7-ые сутки культивирования. В качестве контроля использовали макрофаги, которые культивировали без добавления факторов активации поляризации, их условно принимали за М0-макрофаги.

Иммуноцитохимическое исследование. Проводили через 24 часа после активации макрофагов. Для оценки экспрессии маркеров макрофагов использовали первые антитела к CD68 (1:100, Abcam), iNOs (1:100, Abcam), Arg1 (1:100, Abcam), CD206, Ki67 (1:100, Santa Cruz). Вторые антитела были конъюгированы с FITC (1:200, Abcam). Ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich). Исследование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems).

Проточная цитофлуориметрия. Пермеабиллизацию и фиксацию клеток осуществляли набором InsideStainKit (MiltenyiBiotec) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ проводили на цитофлуориметре Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter) с помощью программы CXP (BeckmanCoulter) с использованием антител: CD68- PEVio770 (MiltenyiBiotec), CD86-VioBright FITC (MiltenyiBiotec), CD11/b-PE (MiltenyiBiotec), CD163-PE (Thermo Fisher).

Таблица 1. Маркеры, использованные для оценки фенотипа клеток

CD11/b	интегрин альфа-М, маркер макрофагов костномозгового происхождения
CD68	общий пан-макрофагальный маркер
CD86	мембранный белок костимулятор Т-лимфоцитов, маркер М1 макрофагов
CD163	трансмембранный белок-регулятор острой фазы, опосредующий эндоцитоз гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов, маркер М2 макрофагов
CD206	маннозный рецептор, маркер М2 макрофагов
Arg1	аргиназа, маркер М2 макрофагов
iNOs	индуцируемая NO синтаза, маркер М1 макрофагов
Ki67	маркер пролиферации клеток

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Исследование проводили через 24 и 72 часа после активации. Из образцов выделяли тотальную РНК набором RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия). Синтез кДНК с матрицы тотальной РНК осуществляли с использованием набора MMLV RT kit (Евроген). С полученными кДНК ставили ПЦР наборами qPCRMix-HS SYBR (Евроген). Праймеры для ПЦР подбирали программой Primer-BLAST. Выбранные праймеры синтезированы фирмой Евроген (Россия). Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M.V. Pfaffl [2001] с учетом рекомендаций J. Vandesompele [2002]. В качестве эндогенного контроля был выбран ген домашнего хозяйства *GAPDH*. Уровень экспрессии гена в активированных макрофагах нормировали на соответствующий показатель в неактивированных клетках.

Таблица 2. Функциональные группы исследуемых генов

Провоспалительные цитокины: Интерлейкин 1 β , Интерлейкин 6, Интерлейкин 12a, Интерлейкин 12b, Интерлейкин 18, Интерлейкин 23, Фактор некроза опухоли α	Противовоспалительные цитокины: Интерлейкин 10, Интерлейкин 4, Интерлейкин 13, Трансформирующий фактор роста b
Факторы миграции клеток: Матричная металлопротеиназа-2, Матричная металлопротеиназа-9	Эндогенные (тканевые) ингибиторы металлопротеиназ: Timp 1, Timp2
Маркеры макрофагов: Индуцируемая NO синтаза – iNOs, Аргиназа - Arg1, CD68	Эндогенный контроль: Ген домашнего хозяйства - GAPDH

Иммуноферментный анализ. Для оценки активности синтеза провоспалительных (TNF α , IL1 β , IL6) и противовоспалительных (IL10) цитокинов применяли полуколичественный анализ содержания белка в образцах с помощью наборов для иммуноферментного анализа (Cloud-CloneCorp.) в соответствии с рекомендациями производителя. Использовали кондиционированную среду, отобранную через 24 и 72 часа после активации макрофагов. Нормирование данных проводили по концентрации общего белка по методу Бредфорда набором Quick Start Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad). Измерение оптической плотности ($\lambda=450$ нм) проводили на спектрофотометре Multiskan GO (ThermoFisher Scientific). Анализ данных проводили онлайн-приложением <http://elisaanalysis.com/app>.

Изучение фагоцитарной активности макрофагов. Клетки сажали на чашки Петри для прижизненной микроскопии с толщиной дна 170 мкм и коэффициентом оптического преломления 1,52 (Ibidi), добавляли латексные частицы 1,5 мкм (Диа-М), 5 мкл 10% суспензии на 1 мл среды. С помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL и программного обеспечения AxioVs40 4.8.2.0 вели прижизненную съемку клеток через 1, 2, 5 и 24 часа после добавления латексных частиц.

Изучение поглощения частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green. Макрофаги культивировали в 96-луночных планшетах Glass Bottom Viewplate-

96, (PerkinElmer Inc), активировали в направлении M1 или M2-фенотипа, добавляли частицы зимозана, конъюгированные с pHrodo™ Green (Thermo Fisher). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью прибора Cytation 3 MFV (Biotek) и программного обеспечения Software Gen5 3.0 Image Prime (Biotek).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Клетки фиксировали в растворе глутарового альдегида с дофиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия, обезживали по общепринятой схеме, контрастировали и производили заливку в смесь эпон-аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме "LKB-III" (Швеция), дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 100CX-II (Jeol, Япония). Полутонкие срезы готовили на ультратоме "LKB-III" (Швеция), окрашивали 1% раствором толудинового синего и просматривали на световом микроскопе "Leica DM 2500" с цифровой камерой "Leica DFC 290" (Германия).

Статистический анализ. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (стандартных ошибок среднего) или медиан и перцентилей. После проверки нормальности распределения данных сравнение выборочных долей проводили с помощью z-теста, при нормальном распределении - t-теста для парных сравнений и теста Хольма-Сидака для множественных сравнений и при распределении, отличного от нормального - теста Манна-Уитни для парных сравнений и теста Дана для множественных сравнений. Для множественных сравнений в случае нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), при отличном от нормального распределения данных использовали ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks). Различия считали достоверными при 5% уровне значимости. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка оптимальной методики селективного изолирования и получения первичной культуры макрофагов

Разработана оптимальная методика селективного изолирования и получения первичной культуры клеток Купфера из интактной печени крысы и макрофагов из периферической крови. Для получения клеток Купфера использовали описанные протоколы [Zeng и др., 2013; Zhang и др., 2016] в модификации. Методики основаны на фракционном центрифугировании в одноступенчатом градиенте плотности растворов высокомолекулярных сополимеров полисахарозы и селективной адгезии клеток к поверхности культурального пластика [Alpini и др., 1994; Cai и др. 2005]. Многочисленные модификации способов выделения клеток Купфера из печени [Braet и др., 1994; Kitani и др., 2010; Li и др., 2014; Meyer и др., 2016] основываются на классическом методе, описанном в 1985 году [Smedsrod, Pertoft, 1985], согласно которому чистота выделенной популяции по маркеру CD68 составляет 90-95%, что согласуется с данными, полученными в эксперименте. Полученные первичные культуры макрофагов содержали около 90% клеток, положительных по маркеру CD68, рассматриваемому как специфический пан-макрофагальный маркер [Behnke и др., 2018; Halдар, Murphy, 2014; Movita и др., 2012; Zigmond и др., 2014]. Макрофаги, выделенные

из костного мозга, экспрессируют маркер CD11b на высоком уровне [Haldar, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2018; Movita и др., 2012; Perdiguero, Geissmann, 2016; Zigmond и др., 2014], поэтому его чаще всего используют в качестве маркера макрофагов моноцитарного происхождения. Более 90% костномозговых макрофагов имели на своей поверхности CD11b, в то время как положительные по маркеру CD11b клетки Купфера составляли около 7% от всей выделенной из печени популяции макрофагов (Рис. 1). Предложенные протоколы получения первичных культур макрофагов позволили получить стабильные жизнеспособные культуры с воспроизводимым иммунофенотипом, который достоверно относит их к макрофагам эмбрионального происхождения (высокая экспрессия пан-макрофагального маркера CD68 и отсутствие экспрессии CD11b) и костномозгового происхождения (высокая экспрессия пан-макрофагального маркера CD68 и CD11b).

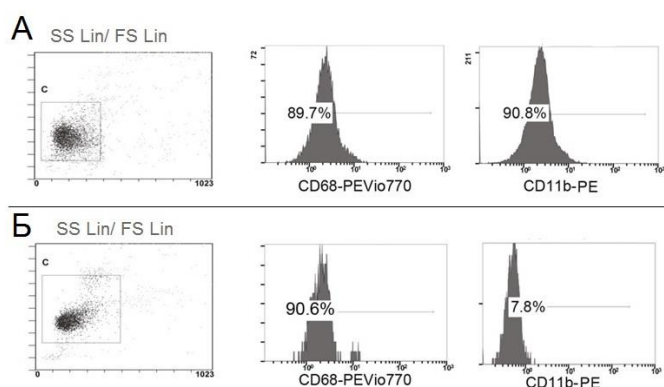
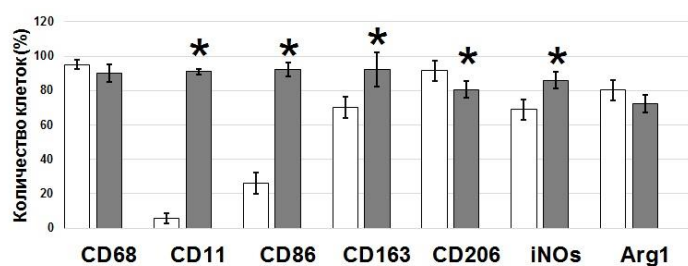


Рис. 1. Определение стратегии гейтирования, оценка чистоты по экспрессии маркеров CD68, CD11b первичных культур (M0) макрофагов костномозгового происхождения (А) и клеток Купфера (Б).

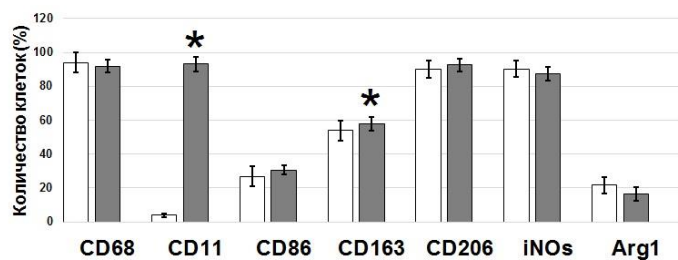
Характеристика иммунофенотипов интактных и поляризованных макрофагов

Согласно M1/M2 парадигме поляризации макрофагов, выделяют два типа их активации: провоспалительный путь (M1-фенотип), и противовоспалительный (M2-фенотип). Клетки в зависимости от условий их активации и факторов микроокружения начинают по-разному экспрессировать поверхностные и внутриклеточные маркеры, факторы роста, рецепторы, эффекторные молекулы, цитокины и хемокины. Показано, что оба вида макрофагов отвечают на факторы, индуцирующие M1 и M2 поляризацию. Клетки разного происхождения одинаково реагировали на индуцирующие среды изменением экспрессии iNOs и Arg1: под влиянием M1-индуцирующих факторов в них активизируется синтез iNOs, под влиянием M2 – Arg1. iNOs и аргиназу относят к наиболее релевантным и информативным маркерам функциональных состояний макрофагов. Повышенная экспрессия iNOs характерна для активированного M1 фенотипа, в то время как Arg1 начинает экспрессироваться на высоком уровне при M2 поляризации [Duluc и др., 2007; Mantovani и др., 2004; Porta и др., 2015; Röszer, 2018; Schultze, Schmidt, 2015; Shapouri-Moghaddam и др., 2018; Viola и др., 2019]. Добавление в культуры клеток Купфера факторов активации как M1, так и M2 статистически значимо не влияло на экспрессию CD206. В культурах M1 и M2 костномозговых макрофагов наблюдали аналогичную экспрессию CD206. В костномозговых макрофагах под влиянием M1-факторов выраженность экспрессии CD86 достоверно снижалась, а под влиянием M2 оставалась на высоком уровне по сравнению с M0 макрофагами. Воздействие факторов поляризации M2 незначительно влияло на экспрессию CD163 в

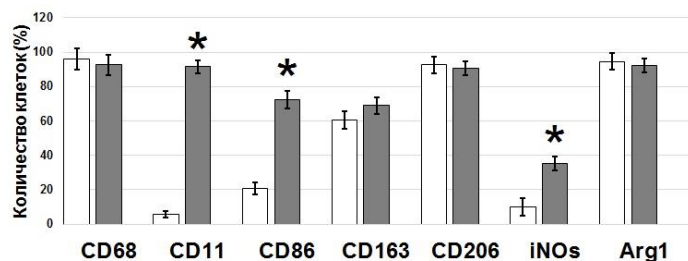
клетках Купфера и приводило к снижению количества клеток, положительно по CD86. Влияние M2 - среды было сходным и для костномозговых макрофагов. Количество клеток, экспрессирующих CD163 и CD86, снизилось по сравнению с клетками M0. При этом количество клеток, экспрессирующих CD163 и CD86, было значительно больше после воздействия факторов M2 поляризации, чем M1. Маркер CD163 экспрессировался на высоком уровне в M0 макрофагах, как костномозгового происхождения, так и в клетках Купфера, при этом количество CD163⁺ клеток среди M0 костномозговых макрофагов было значимо больше. После воздействия M1 и M2 факторов количество CD163⁺ костномозговых макрофагов снижалось по сравнению с M0 и не отличалось от соответствующих показателей клеток Купфера. Факторы активации не влияли на экспрессию пан-макрофагальных маркеров CD68 и CD11b в макрофагах обоих типов. Экспрессия CD68 – для эмбриональных макрофагов, CD68 и CD11b – для костномозговых оставалась достоверно высокой как в условиях M1, так и M2 факторов активации, что подтверждает представление о них как о пан-маркерах клеток макрофагальной природы, не характеризующих функциональное состояние клеток и не зависящих от условий микроокружения [Bale и др., 2016; Sharouri-Moghaddam и др., 2018; Zhang и др., 2016] (Рис. 2).



Экспрессия маркеров в интактных (M0) клетках Купфера (белые столбики) и макрофагах костномозгового происхождения (серые столбики).



Экспрессия маркеров в клетках Купфера (белые столбики) и макрофагах костномозгового происхождения (серые столбики), активированных по провоспалительному M1-фенотипу (M1).



Экспрессия маркеров в клетках Купфера (белые столбики) и макрофагах костномозгового происхождения (серые столбики), активированных по противовоспалительному M2-фенотипу (M2).

Рис. 2. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD206, CD163, iNOs, Arg1 в клетках Купфера и макрофагах костномозгового происхождения без воздействия факторов активации (M0) и активированных по M1 и M2-фенотипам. *- статистически значимые различия, $p < 0,05$. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты оценки экспрессии пан-макрофагальных маркеров (CD11b, CD68) и маркеров функционального состояния (CD163, CD86, CD206, Arg1, iNos) макрофагами разных генераций обобщены на схеме (Рис. 3).

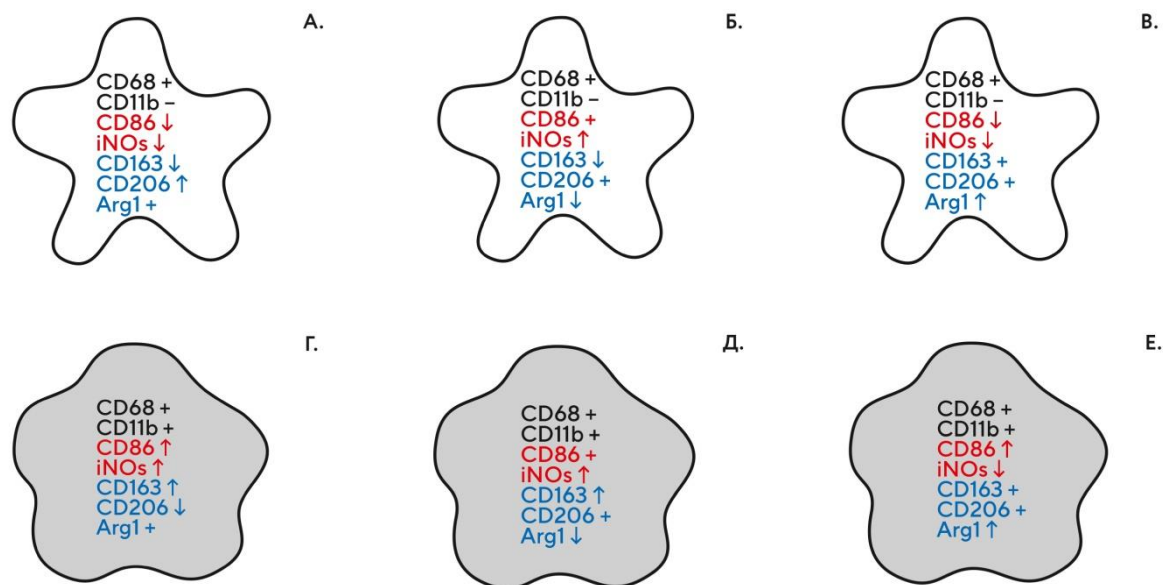


Рис. 3. Иммунофенотипы intactных (M0) и поляризованных (M1, M2) клеток Купфера (КК) и костномозговых (моноцитарных) макрофагов (МОН). А – КК M0; Б – КК M1; В – КК M2; Г – МОН M0; Д – МОН M1; Е – МОН M2.

Морфология и ультраструктура нативных и поляризованных макрофагов

В культуре морфология прикрепившихся к пластику макрофагов зависит от источника их получения. Костномозговые макрофаги, выделенные в первичную культуру, имели округлую форму. Клетки Купфера после адгезии ко дну культурального флакона приобретали полигональную, треугольную, реже веретеновидную форму (Рис. 4).

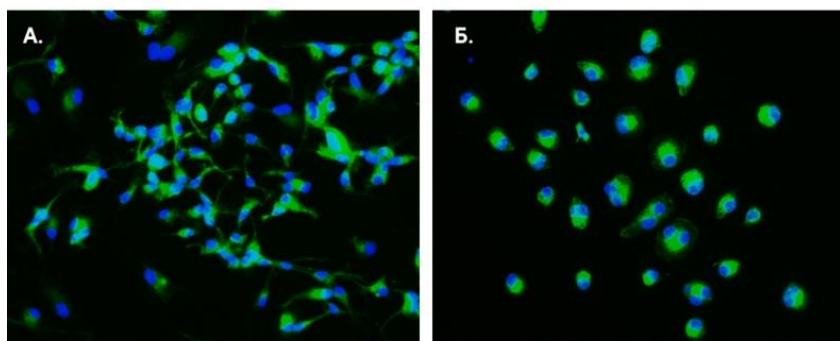


Рис 4. Морфология клеток Купфера (А) и костномозговых макрофагов (Б), экспрессия CD68 – зеленое свечение (FITC), докраска ядер DAPI – синее свечение, увеличение $\times 200$.

Морфология клеток под влиянием факторов активации M1 и M2 фенотипов незначительно изменялась. Клетки обеих популяций под действием факторов активации M1 фенотипа становились более отростчатыми, в то время как при культивировании в присутствии факторов фенотипа M2 макрофаги становились округлыми (Рис. 5).

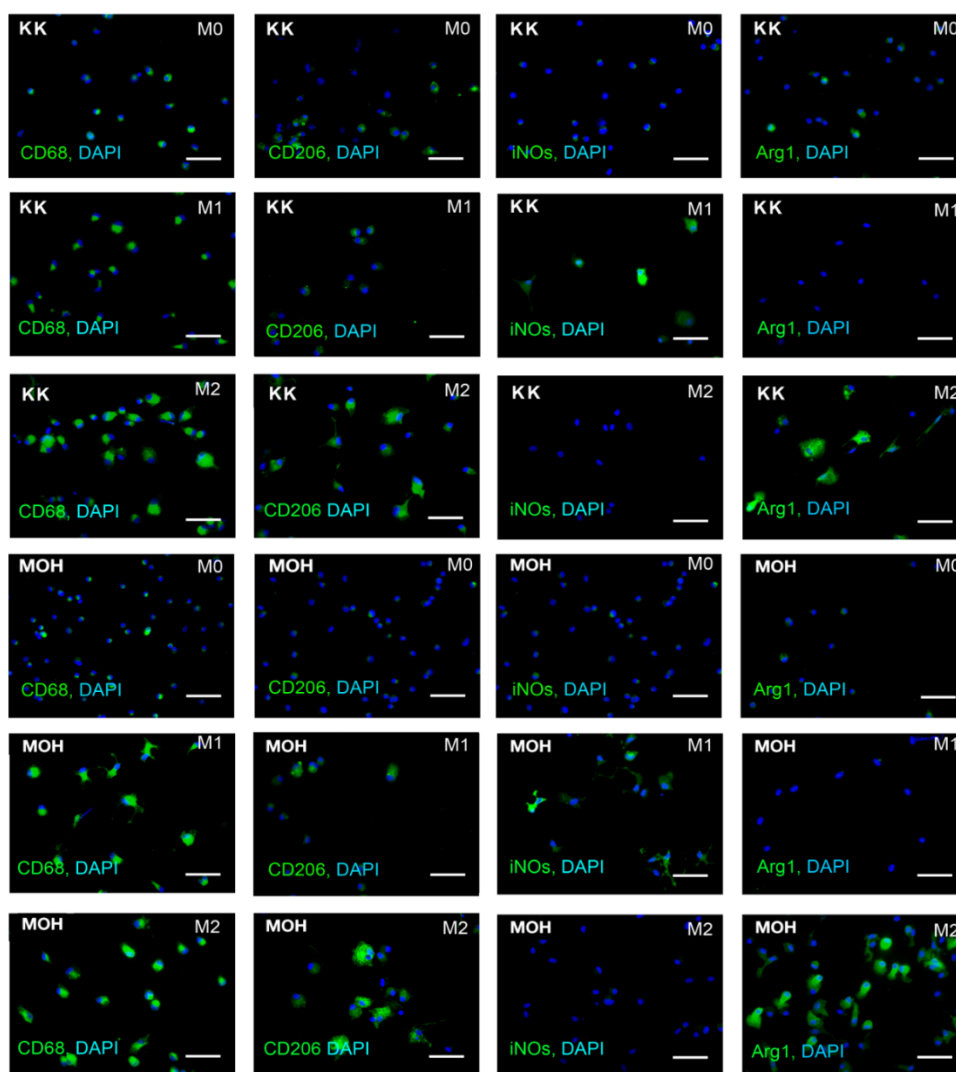


Рис 5. Фенотипы intactных (M0) и поляризованных (M1, M2) клеток Купфера (KK) и костномозговых (моноцитарных) макрофагов (MOH). Экспрессия маркеров CD68, CD206, iNOs, Arg1., масштабный отрезок – 50 мкм.

Анализ изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии, выявил общие закономерности строения макрофагов разного происхождения и разного физиологического состояния. Клетки Купфера имеют неправильную полигональную, многоотростчатую форму, для отдельных клеток также типична звездчатая форма. Макрофаги костномозгового происхождения - округлые. Поверхность клеток неровная, имеющая небольшие отростки – псевдоподии, радиально вытянутые от поверхности клетки. Клеточная мембрана всех типов макрофагов образует многочисленные складки, для поверхности клеток также характерны микроворсинки. Цитоплазма богата первичными и вторичными лизосомами и эндоцитозными микровезикулами. Ядро округлой или эллипсоидной формы расположено преимущественно на периферии, реже центрально, под ядерной оболочкой локализуется гетерохроматин. На поверхности клеточных мембран макрофагов как эмбрионального, так и костномозгового происхождения четко визуализируется гликокаликс. Митохондрии во всех типах изученных клеток немногочисленны, аппарат Гольджи и

гранулярная эндоплазматическая сеть развиты умеренно. Значительных ультраструктурных отличий, зависящих от происхождения и функционального статуса (M0, M1, M2) изучаемых клеток, отмечено не было.

Оценка уровня экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление

Показано, что для костномозговых макрофагов и клеток Купфера характерен разный паттерн экспрессии M1- и M2- ассоциированных генов. В клетках Купфера вне зависимости от факторов, активирующих M1 и M2 фенотипы, и в интактных макрофагах достоверно выше, чем в костномозговых макрофагах, экспрессировались гены противовоспалительных цитокинов – *IL4*, *IL10*, *IL13*, *Arg1*. В костномозговых макрофагах вне зависимости от факторов, активирующих M1 и M2 фенотипы, и в интактных достоверно экспрессировались гены провоспалительных цитокинов *IL1β*, *IL12a*, *TNFα*, *iNOs* (Рис 6). Результаты исследования экспрессии генов подтверждают гипотезу о существовании фенотипического и функционального континуума макрофагов, крайними точками которого являются «идеальные» M1 и M2 макрофаги. Полученные результаты показали, что макрофаги костномозгового происхождения быстрее и интенсивнее реагируют на факторы активации, изменяя фенотип в M1 направлении, в то время как клетки Купфера, макрофаги эмбрионального происхождения, коммитированы в M2 направлении. Установленное более позднее начало экспрессии провоспалительных цитокинов, особенно *TNFα*, после активации культуры клеток Купфера, возможно, является признаками ЛПС-толерантности резидентных макрофагов печени [Elchaninov и др., 2016; Elchaninov и др., 2018]. Эти данные согласуются с ранее полученными, в соответствии с которыми в ходе репаративной регенерации печени после субтотальной резекции у крыс популяция макрофагов регенерирующей печени представлена в основном клетками, несущими маркер M2 макрофагов CD206 [Guilliams, Scott, 2017; Scott и др., 2016]. В аспекте участия клеток Купфера в регенерации печени представляет интерес повышение экспрессии генов *IL4* и *IL13*. В настоящее время роль *IL4* и *IL13* в репаративном процессе мало изучена. Имеются единичные сообщения о том, что *IL4* играет ключевую роль в инициации пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени [Goh и др., 2013], в то время как *IL13* регулирует пролиферацию холангиоцитов и активность фибробластов в печени [Gieseck и др., 2016]. При этом макрофаги моноцитарного происхождения по сравнению с резидентными макрофагами печени в целом обладают большей чувствительностью к факторам M1 активации и особенно LPS что, возможно, связано с развитием LPS-толерантности в резидентных макрофагах.

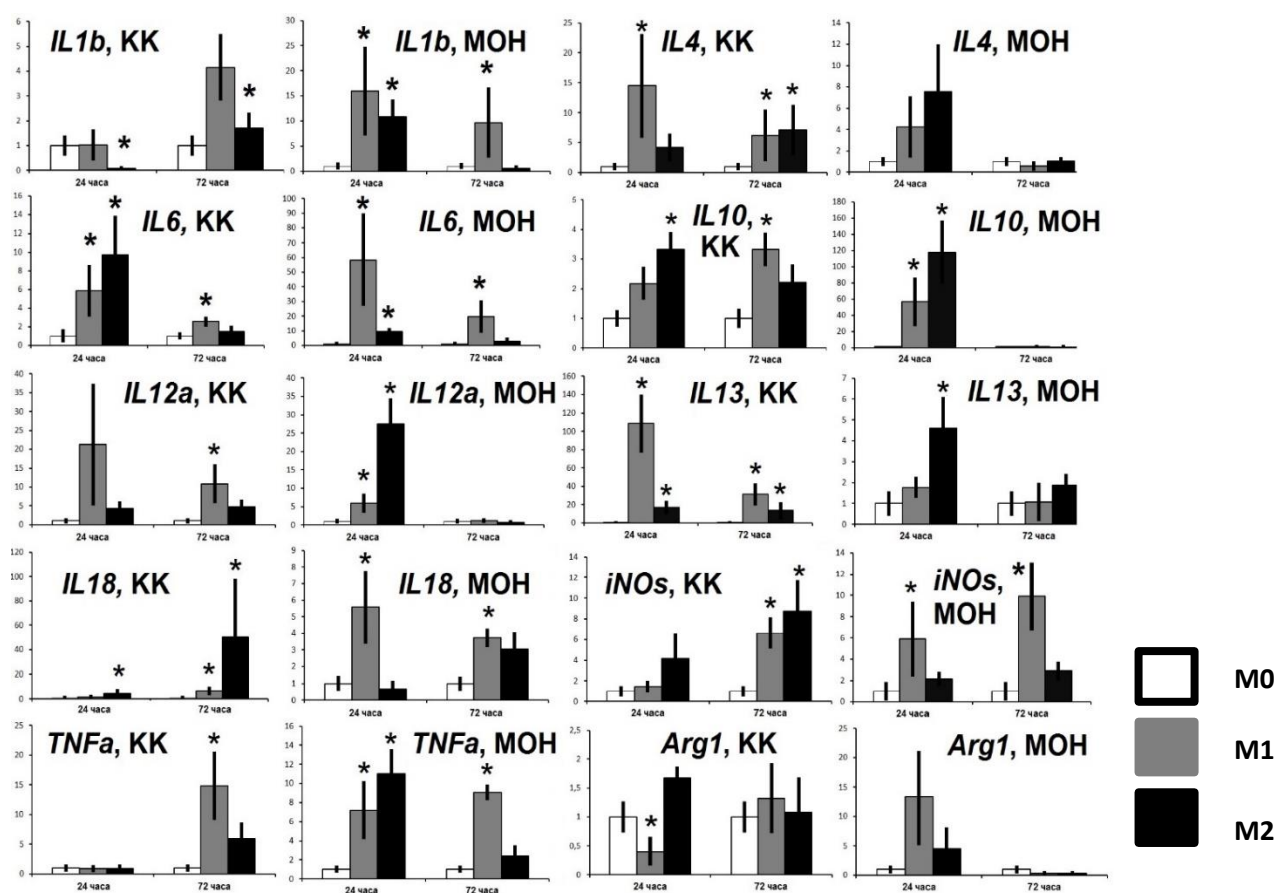


Рис. 6. Профиль экспрессии генов интактных (M0) и поляризованных (M1, M2) макрофагов костномозгового происхождения (МОН) и клеток Купфера (KK) в *- статистически значимые различия по сравнению с интактными макрофагами, $p < 0,05$.

Полуколичественный анализ секреции сигнальных молекул в кондиционированной среде нативных и поляризованных макрофагов

При определении концентрации IL1 β в культуральной среде макрофагов обнаружено, что в среде клеток Купфера концентрация IL1 β значимо повышалась только под влиянием M1 - факторов через 3 суток после активации ($p < 0,05$). При изучении продукции IL1 β костномозговыми макрофагами разница между группами отсутствовала ($p > 0,05$). Динамика продукции IL6 и IL10 различалась в зависимости от происхождения макрофагов. Концентрация интерлейкинов повышалась как в культуре клеток Купфера, так и костномозговых макрофагов только через 1 сутки после активации ($p < 0,05$), при этом в клетках Купфера повышение происходило под влиянием M2-активаторов, а в костномозговых макрофагах - M1. Характер продукции TNF α в культурах костномозговых и эмбриональных макрофагов различался. В кондиционированных средах, полученных от клеток Купфера после активации M1 и M2-факторами, отличия в содержании TNF α отсутствовали ($p < 0,05$). В культуре костномозговых макрофагов продукция TNF α значимо увеличивалась через 1 сутки после активации M2-факторами ($p < 0,05$). Таким образом, характер секреции провоспалительных (IL1 β , IL6, TNF α) и противовоспалительных (IL10) цитокинов в кондиционированных средах нативных и поляризованных по M1 и M2 пути клеток

Купфера и макрофагов костномозгового происхождения отличался и не всегда зависел от активации по M1 или M2 фенотипу и имел разную динамику для макрофагов разного происхождения (Рис 7).

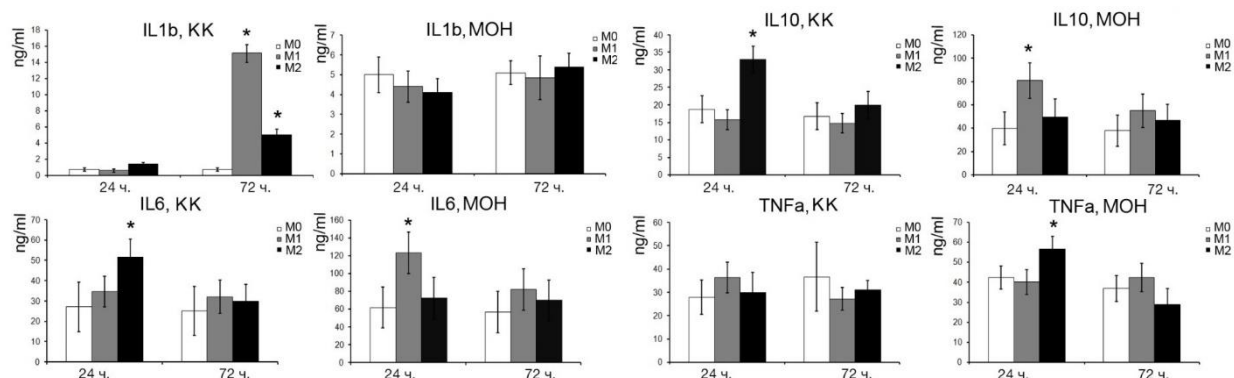


Рис. 7. Динамика продукции (в нг/мл) TNFα, IL1β, IL6, IL10 в кондиционированной среде интактных (M0) и поляризованных (M1, M2) клеток Купфера (KK) и макрофагов костномозгового происхождения (МОН). *- статистически значимые различия по сравнению с кондиционированной средой интактных клеток, $p < 0,05$.

Исследование функциональных характеристик макрофагов

Фагоцитарная активность и презентация антигенов являются ключевыми функциями макрофагов. Различия между макрофагами костномозгового и эмбрионального происхождения по этим показателям, возможно, лежат в основе распределения типов макрофагов в организме млекопитающих. Показано, что в дерме кожи и рыхлой волокнистой соединительной ткани стенки кишечника, то есть в органах, испытывающих наибольшую антигенную нагрузку, присутствуют исключительно макрофаги костномозгового происхождения [Chazaud, 2014; Gomez Perdiguero и др., 2015a; Perdiguero, Geissmann, 2016], тогда как функция эмбриональных макрофагов заключается в большей степени в регуляции клеточного гомеостаза и баланса между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса. При изучении фагоцитарной активности был обнаружен ряд особенностей клеток Купфера по сравнению с макрофагами костномозгового происхождения. Интактные костномозговые макрофаги демонстрировали более выраженную фагоцитарную активность. Ранее также было установлено, что макрофаги костномозгового происхождения, мигрирующие в печень после ионизирующего облучения, обладают более высокой фагоцитарной активностью по сравнению с клетками Купфера [Beattie и др., 2016]. Далее происходило нарастание фагоцитарной активности клеток Купфера, и через 2 часа после начала эксперимента различий уже не было отмечено, но через 5 часов уровень фагоцитоза у клеток Купфера резко превышал таковой у костномозговых макрофагов, а через 24 часа они не отличались. Активация факторами M1 и M2 фенотипа приводила к повышению фагоцитарной активности как макрофагов костномозгового происхождения, так и клеток Купфера. При этом наибольшее влияние на фагоцитарную активность оказывали факторы M1-фенотипа. Следует отметить, что в макрофагах костномозгового происхождения влияние M1- среды поддерживало фагоцитарную активность на

достоверно более высоком уровне по сравнению с М0 более длительное время. Статистически значимые различия были выявлены через 5 часов после начала эксперимента. В клетках Купфера через 5 часов разница между активированными по М1 фенотипу и неактивированными клетками отсутствовала (Рис. 8).

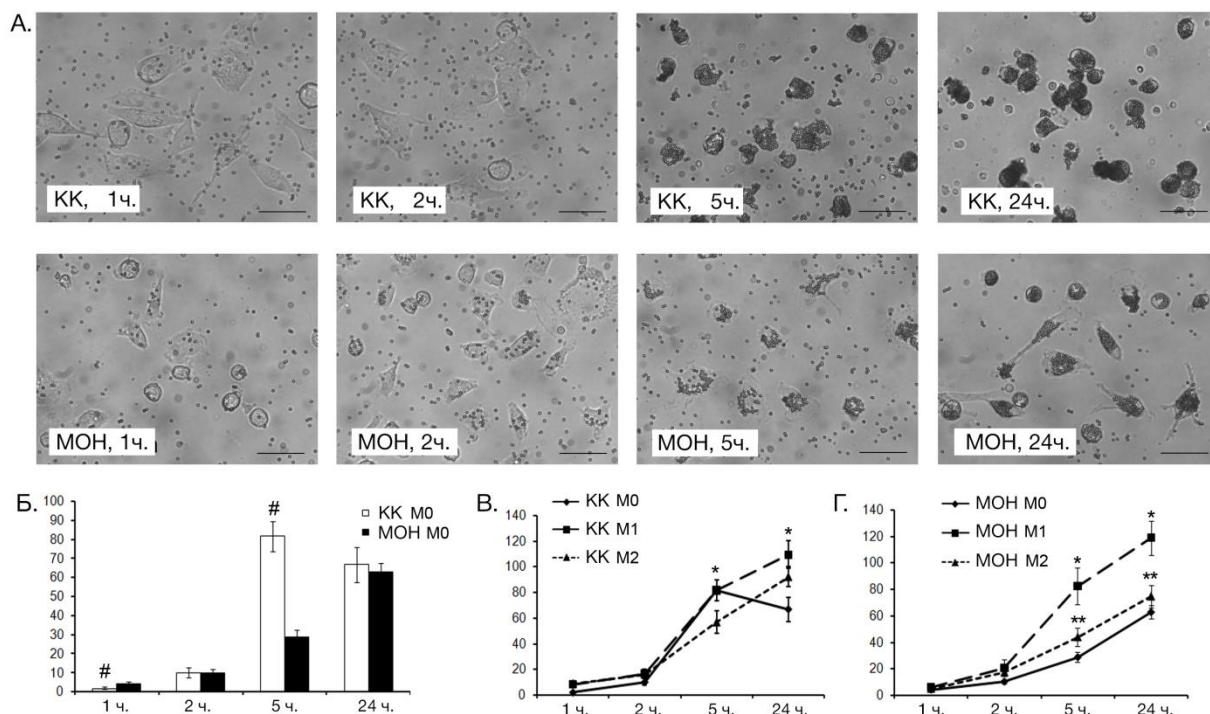


Рис. 8. А - Фагоцитарная активность неактивированных (М0) клеток Купфера (KK) и макрофагов костномозгового происхождения (МОН), фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. Б - фагоцитарная активность М0 клеток Купфера по сравнению с М0 костномозговыми макрофагами, # - статистически значимые различия фагоцитарной активности клеток Купфера по сравнению с костномозговыми макрофагами, $p < 0,05$; В - фагоцитарная активность М0 и активированных клеток Купфера, Г - фагоцитарная активность М0 и активированных макрофагов костномозгового происхождения, * - статистически значимые различия по сравнению с интактными культурами клеток, $p < 0,05$. По осям абсцисс - количество фагоцитированных силиконовых частиц на 1 клетку, по осям ординат - время. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

На ультраструктурном уровне заметных изменений морфологии фагоцитирующих клеток по сравнению с клетками, находящимися в покое, отмечено не было (Рис 9).

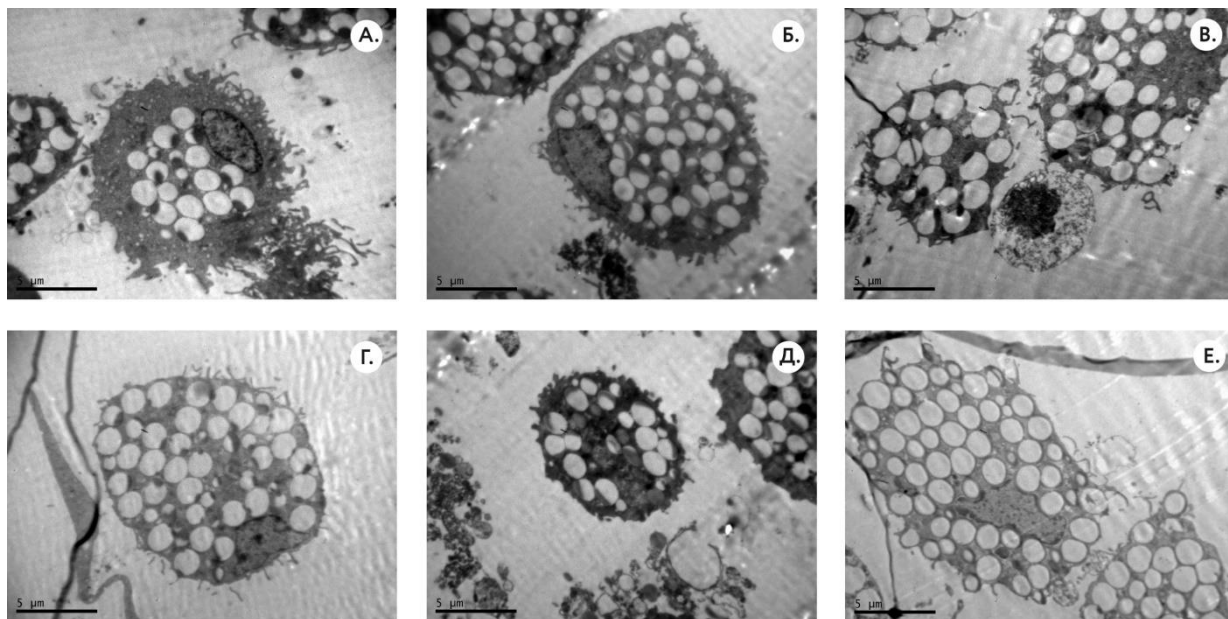


Рис. 9. Ультраструктура фагоцитирующих интактных (M0) и поляризованных (M1, M2) клеток Купфера (КК) и костномозговых макрофагов (МОН), масштабный отрезок – 5 мкм. А – КК M0; Б – КК M1; В – КК M2; Г – МОН M0; Д – МОН M1; Е – МОН M2

Изучение пролиферативной активности методом иммуноцитохимии

В настоящее время в литературе нет единого мнения об особенностях пролиферации макрофагов в зависимости от источника их происхождения и функционального статуса [Jenkins и др., 2011; Zigmond и др., 2014]. По мнению Jenkins SJ и соавторов, макрофаги костномозгового происхождения утратили способность к пролиферации в отличие от макрофагов эмбрионального происхождения. Эксперимент по оценке пролиферативного потенциала макрофагов двух генераций методом иммуноцитохимии с использованием маркера пролиферации Ki67 показал, что пролиферация обоих типов макрофагов наблюдается только в условиях воздействия факторов активации M2 фенотипа, которые включают колониестимулирующий фактор M-CSF и IL4. Данные особенности пролиферативной активности клеток Купфера, вероятно, лежат в основе того, что при токсическом повреждении печени популяция макрофагов временно восстанавливается за счет макрофагов костномозгового происхождения, которые мигрируют в орган. Неспособность резидентных макрофагов печени к митотическому размножению в условиях токсического повреждения печени, возможно, связана с отсутствием в печени IL4 [Zigmond и др., 2014].

Полученные результаты сравнения интактных и активированных по M1 и M2 фенотипу резидентных макрофагов печени и макрофагов костномозгового происхождения обобщены в таблице (Таблица 3).

Таблица 3. Результаты сравнения интактных и активированных по M1 и M2 фенотипу макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения.

Изучаемая характеристика	Макрофаги эмбрионального происхождения (клетки Купфера)	Макрофаги костномозгового происхождения
Неактивированные интактные M0		
Иммунофенотип	CD68 ⁺ CD163 ⁺ CD11b ⁻ CD86 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁺	CD68 ⁺ CD163 ⁺ CD11b ⁺ CD86 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁺
Форма	полигональная, треугольная, веретенновидная	округлая
Экспрессия генов	Il1β ↑ Il10 ↑ Arg ↑	Il13 ↑ Il18 ↑
Секреция белков	TNFα, Il6, Il10	TNFα, Il1β, Il6, Il10
Фагоцитоз	1 час: ↑ 2 часа: ≈ 5 часов: ↑ 24 часа: ≈	1 час: ↓ 2 часа: ≈ 5 часов: ↓ 24 часа: ≈
Пролиферация	отсутствует	отсутствует
Активированные по M1 фенотипу		
Иммунофенотип	CD68 ⁺ CD11bCD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁻	CD68 ⁺ CD11b ⁺ CD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁻
Форма клеток	незначительные изменения: клетки становились более отростчатыми	незначительные изменения: клетки становились более отростчатыми
Экспрессия генов	Il1β ↑ Il4 ↑↑ Il6 ↑ Il10 ↑↑ Il13 ↑↑ TNFα ↑ Arg ↑	Il1β ↑↑ Il6 ↑ Il18 ↑ TNFα ↑↑ iNOs ↑↑
Секреция белков	Il1β ↑ 3сутки	Il6 ↑ 1 сутки Il10 ↑ 1 сутки
Фагоцитоз	↑↑ в сравнении с M0	↑↑ в сравнении с M0
Пролиферация	отсутствует	отсутствует
Активированные по M2 фенотипу		
Иммунофенотип	CD68 ⁺ CD11bCD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁻ Arg1 ⁺	CD68 ⁺ CD11b ⁺ CD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁻ Arg1 ⁺
Форма	незначительные изменения: клетки становились более округлыми	незначительные изменения: клетки становились более округлыми
Экспрессия генов	Il4 ↑ Il10 ↑ Il18 ↑	Il1β ↑ Il12 ↑ TNFα ↑ Arg ↓
Секреция белков	Il1β ↓ 3сутки Il6 ↑ 1 сутки Il10 ↑ 1 сутки	TNFα ↑ 1 сутки
Фагоцитоз	↑ в сравнении с M0	↑ в сравнении с M0
Пролиферация	клетки пролиферируют	клетки пролиферируют

Остается неясным, являются ли установленные свойства клеток Купфера присущими всем макрофагам эмбрионального происхождения или они обусловлены только особенностью кровоснабжения печени и микроокружением. Для этого необходимы дальнейшие сравнительные исследования макрофагов разного происхождения.

Заключение. Целью работы было проведение сравнительного исследования клеток Купфера и костномозговых макрофагов. Рабочей гипотезой данного исследования было предположение о том, что макрофаги разного происхождения отличаются по

функциональным свойствам, что определяет их различную роль в воспалении, регенерации и туморогенезе. Полученные результаты свидетельствуют о несостоятельности M1/M2 концепции в отношении классификации макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения. Фенотип и функциональные свойства клеток динамически изменяются в зависимости от условий их микроокружения. Результаты проведенного исследования подтверждают гипотезу о существовании фенотипического и функционального континуума (спектра) макрофагов, который определяется неконститутивными условиями микроокружения. Разделение на «идеальные» M1 и M2 макрофаги, как иммунофенотипическое (по поверхностным и внутриклеточным маркерам), так и функциональное (по фагоцитарной активности и продукции сигнальных молекул) является лишь удобной классификационной системой. Расширение представлений об особенностях макрофагов различного происхождения имеет не только фундаментальное, но и большое практическое значение. Интерес представляют выявленные особенности функциональной пластичности макрофагов, которые необходимо учитывать при активации макрофагов как *in situ*, так и *ex vivo* по пути провоспалительных или противовоспалительных макрофагов для применения в качестве терапевтического инструмента для регуляции клеточного гомеостаза при лечении воспалительных и онкологических заболеваниях человека.

ВЫВОДЫ

1. Интактные макрофаги (M0) разного происхождения отличаются по иммунофенотипическим свойствам: в макрофагах эмбрионального происхождения отсутствует экспрессия интегрина альфа-M (CD11b), в то время как макрофаги костномозгового происхождения экспрессируют данный маркер на высоком уровне. Интактные макрофаги костномозгового происхождения характеризуются высокой экспрессией маркера M1-активации – мембранного белка костимулятора Т-клеток (CD86) и индуцируемой синтазы оксида азота (iNOs), а клетки Купфера - маркера M2-активации – маннозного рецептора (CD206).
2. При активации в M1 и M2 направлениях клетки Купфера и костномозговые макрофаги изменяют свой иммунофенотип. Оба типа клеток одинаково реагируют на ряд индуцирующих факторов: под влиянием M1-индуцирующих факторов LPS и IFN- γ в клетках активизируется синтез iNOs, под влиянием M2-факторов IL4, IL10 и IL13 - Arg1.
3. Макрофаги разного происхождения отличаются по морфологии: клетки Купфера имеют неправильную веретеновидную форму, костномозговые макрофаги - округлую. Клетки обеих популяций под действием факторов M1 активации становятся отростчатыми, при M2 активации клетки приобретают округлую форму. Ультраструктурных различий макрофагов разного происхождения не выявлено.
4. Для клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения характерен разный паттерн экспрессии M1- и M2- ассоциированных генов цитокинов, регулирующих воспаление. Интактные и активированные клетки Купфера, независимо от направления активации, характеризуются высокой экспрессией генов

противовоспалительных цитокинов – *IL4*, *IL10*, *IL13*, *Arg1*. Костномозговые макрофаги в тех же условиях активации на более высоком уровне экспрессируют гены провоспалительных цитокинов – *IL1β*, *IL12a*, *TNFα*, *iNOs*. При оценке секреции цитокинов, регулирующих воспаление (*TNFα*, *IL1β*, *IL6*, *IL10*), таких закономерностей не выявлено.

5. По сравнению с клетками Купфера макрофаги костномозгового происхождения обладают более выраженной фагоцитарной активностью, при этом ультраструктурных различий фагоцитирующих клеток не обнаружено. В первичных культурах макрофагов из разных источников происхождения клетки начинают пролиферировать только в условия M2-активации при воздействии M-CSF и *IL-4*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Lokhonina A.V., Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.Kh., Makarov A.V., Arutyunyan I.V., Grinberg M.V., Glinkina V.V., Surovtsev V., Bolshakova G.B., Goldshtein D.V., Sukhikh G.T. Activated Macrophages of Monocytic Origin Predominantly Express Proinflammatory Cytokine Genes, Whereas Kupffer Cells Predominantly Express Anti-Inflammatory Cytokine Genes. // BioMed Research International. – 2019. – Т. 2019. – С. 1–13. doi: 10.1155/2019/3912142.
2. Elchaninov A.V., Fatkhudinov T.K., Vishnyakova P.A., Lokhonina A.V., Sukhikh G.T. Phenotypical and Functional Polymorphism of Liver Resident Macrophages. // Cells. – 2019. – Т. 8. – С. 1032. doi:10.3390/cells8091032.
3. Лохонина А.В., Покусаев А.С., Арутюнян И.В., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Еремина И.З., Суровцев В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Характеристика иммунофенотипа резидентных макрофагов печени и профиля экспрессируемых генов. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2018. – № 1 (25). – С. 49-60.
4. Лохонина А.В., Ельчанинов А.В., Арутюнян И.В., Покусаев А.С., Макаров А.В., Еремина И.З., Суровцев В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Морфофункциональная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения. // Гены & Клетки. – 2018. – Т. XIII. – № 2. – С. 56-62.
5. Ельчанинов А.В., Лохонина А.В., Макаров А.В., Арутюнян И.В., Гринберг М.В., Ладыгина Г.А., Князева Л.А., Большакова Г.Б., Фатхудинов Т.Х. Анализ фагоцитарной активности макрофагов моноцитарного происхождения и клеток Купфера. // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2018. – Т. 7. – № 3. – С. 13-19.
6. Ельчанинов А.В., Лохонина А.В., Макаров А.В., Вишнякова П.А., Кананыхина Е.Ю., Никитина М.П., Гринберг М.В., Быков А.В., Чарыева И.Г., Большакова Г.Б.,

Фатхудинов Т.Х. Фенотипический полиморфизм клеток Купфера печени крыс в норме. // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 35-39.

Другие публикации

1. Lokhonina A.V., Arutyunyan I.V., Elchaninov A.V., Pokusaev A.S., Makarov A.V., Fatkhudinov T.K., Eremina I.Z., Abramov A.A., Bothey V.M, Kostyaeva M.G., Neborak E.V., Syatkin S.P., Chibisov S.M. Morphological and functional characterization of macrophages derived from embryonic and monocyte sources. // « The 43-rd FEBS Congress». Prague, Czech Republic. – 2018.
2. Лохонина А.В., Гринберг М.В. Сравнительная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. – 2018. – С. 31.
3. Лохонина А.В., Никитина М.П., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Роль макрофагов разного происхождения в регенерации. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 5. – С. 156.
4. Лохонина А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Анализ фагоцитарной активности макрофагов моноцитарного происхождения и клеток Купфера. // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 180.
5. Lokhonina A.V., Elchaninov A.V., Makarov A.V., Eremina I.Z., Arutyunyan I.V., Grinberg M.V., Fatkhudinov T.Kh., Syatkin S.P., Kharlitskaya E.V. Characteristics of the phagocytic activity of macrophages of bone marrow and fetal origin. // FEBS Open Bio. – 2019. – Т. 9. – № 51. – С. 91.
6. Джуманиязова Э.Д., Лохонина А.В. Анализ экспрессии генов-регуляторов воспаления клеток Купфера и моноцитов. Материалы IV Всероссийской конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины». Москва. – 2019. – С. 70.