

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

**ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»**

Министерства Здравоохранения РФ

На правах рукописи

Лохонина Анастасия Вячеславовна

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

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.м.н., доцент Т.Х. Фатхудинов

Москва – 2020

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Классификация макрофагов в зависимости от источника происхождения.....	14
2.2. Характеристика макрофагов эмбрионального происхождения на примере резидентных макрофагов печени – клеток Купфера.....	17
2.3. Характеристика макрофагов костномозгового происхождения	21
2.4. Макрофаги костномозгового происхождения в популяции макрофагов печени	24
2.5. Классификация макрофагов по функциональным свойствам	27
2.6. Макрофаги, активированные по классическому провоспалительному M1 фенотипу	28
2.7. Макрофаги, активированные по альтернативному противовоспалительному M2 фенотипу	29
2.8. Продукция макрофагами цитокинов, хемокинов и факторов роста....	33
2.9. Использование макрофагов в качестве терапевтических инструментов	35
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
3.1. Объект исследования.....	39
3.2. Дизайн исследования.....	39
3.3. Получение клеток Купфера.....	40
3.4. Получение костномозговых макрофагов.....	41
3.5. Культивирование клеток	41
3.6. Активация клеток <i>in vitro</i>	42
3.7. Оценка фенотипа макрофагов.....	44

3.8.	Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	47
3.9.	Иммуноферментный анализ.....	50
3.10.	Изучение фагоцитарной активности макрофагов.....	50
3.11.	Трансмиссионная электронная микроскопия.....	51
3.12.	Статистический анализ.....	52
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
4.1.	Разработка оптимальной методики селективного изолирования и получения первичной культуры клеток Купфера из интактной печени и первичной культуры макрофагов костномозгового происхождения.....	53
4.2.	Иммунофенотип первичной культуры клеток Купфера	53
4.3.	Иммунофенотип первичной культуры костномозговых макрофагов	57
4.4.	Сравнение иммунофенотипов неактивированных (M0) клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.....	59
4.5.	Сравнительная характеристика иммунофенотипа неактивированных (M0) и поляризованных по M1 и M2-фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения по маркерам CD11b, CD68, CD163, CD86, CD206, Arg1, iNOs.....	62
4.6.	M1 активация клеток Купфера.....	64
4.7.	M1 активация макрофагов костномозгового происхождения.....	66
4.8.	M2 активация клеток Купфера.....	70
4.9.	M2 активация макрофагов костномозгового происхождения.....	73
4.10.	Морфология неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.....	78
4.11.	Ультраструктура неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения	79

4.12. Оценка уровня экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление неактивированных и поляризованных клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.....	83
4.12.1. Экспрессия генов провоспалительных цитокинов	83
4.12.2. Экспрессия генов противовоспалительных цитокинов.....	86
4.12.3. Экспрессия генов - маркеров M1 и M2 поляризации	88
4.13. Полуколичественный анализ секреции сигнальных молекул в кондиционированной среде неактивированных и поляризованных клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.....	91
4.14. Исследование функциональных характеристик неактивированных и поляризованных по M1 и M2 фенотипам клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения.....	94
4.14.1. Изучение фагоцитарной активности методом прижизненной фазово-контрастной микроскопии	94
4.14.2. Изучение фагоцитарной активности по скорости поглощения макрофагами частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green	103
4.14.3. Изучение морфологических особенностей фагоцитирующих макрофагов методом трансмиссионной электронной микроскопии.....	105
4.15. Изучение пролиферативной активности методом иммуноцитохимии	107
5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	114
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
ВЫВОДЫ.....	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

1. ВВЕДЕНИЕ

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 [Wyler 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 [Halдар 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 своим функциональным возможностям и роли в репаративных процессах [Gundra и др., 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 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 костномозгового 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 пути 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Макрофаги являются ключевыми участниками, регулирующими разнообразные морфогенетические процессы в организме млекопитающих, в том числе воспаление и репарацию тканей [Arutyunyan и др., 2015; Chazaud, 2014; Epelman, Lavine, Randolph, 2014; Martinez, Gordon, 2014a].

Макрофаги обладают антиген-презентирующей функцией и проявляют фагоцитарную активность. Они постоянно осуществляют проверку окружения на наличие патогенов, клеточного дебриса, апоптотических элементов, различных токсичных метаболитов, а также выделяют большое количество биологически активных веществ, таких как факторы роста и цитокины.

Макрофаги были впервые обнаружены в конце XIX века русским физиологом Ильей Мечниковым и описаны как эволюционно консервативные фагоциты, возникшие более 500 миллионов лет назад [Cooper, Alder, 2006; Tauber, 2003]. Мечников объединил эволюционную и онтологическую теории возникновения этих клеток, первым описав их как клетки, способные к активному фагоцитозу, и ввёл термин «макрофаг» [Cavaillon, 2011; Silverstein, 2011]. В 1970-х годах XX века профессор Ralph van Furth, голландский физиолог и специалист по внутренним инфекционным болезням, сформулировал гипотезу о системе мононуклеарных фагоцитов, в соответствии с которой макрофаги представляют собой производные клеток костного мозга, конечную стадию дифференцировки моноцитов крови [Furth van и др., 1972]. За последнее время концепция происхождения макрофагов была пересмотрена. Продемонстрировано, что резидентные макрофаги тканей взрослых млекопитающих образуются во время эмбрионального развития, сохраняются в зрелом возрасте и в норме не зависят от популяции макрофагов костномозгового происхождения [Ginhoux, Merad, 2010; Guilliams и др., 2013; Hashimoto и др., 2013; Jakubzick и др., 2013; Schulz и др., 2012; Yona и др., 2013].

Последние исследования показали, что макрофаги тканей млекопитающих в постэмбриональном периоде представлены несколькими популяциями, которые различаются по своему происхождению, функциям и механизму поддержания численности [Haldar, Murphy, 2014; Hoeffel и др., 2015a; Hoeffel, Ginhoux, 2018].

2.1. Классификация макрофагов в зависимости от источника происхождения

Согласно современным литературным данным макрофаги млекопитающих берут начало из трех источников происхождения, соответствующих трем поколениям гемопоэтических стволовых клеток [Chazaud, 2014; Gomez Perdiguero и др., 2015a] (Рисунок 1). Клетки первого поколения образуются в стенке желточного мешка - это прогениторные клетки, положительные по маркерам $CD117^{low}$ или $c-Kit^{low}$ (трансмембранный гликопротеин - рецептор фактора роста стволовых клеток) и $CD41^{low}$ (трансмембранный гликопротеин - ранний маркер мегакариоцитарного роста) [Gomez Perdiguero и др., 2015a; Gomez Perdiguero и др., 2015b; Perdiguero, Geissmann, 2016]. Эта генерация гематопоэтических клеток-предшественников также является источником развития клеток микроглии центральной нервной системы [Hoeffel и др., 2015b; Hoeffel, Ginhoux, 2018]. Второе поколение эритромиелоидных клеток-предшественников - кроветворные прогениторные клетки стенки желточного мешка, положительные по маркерам $c-Myb$ (фактор транскрипции, регулирующий дифференцировку и пролиферацию гемопоэтических клеток) и $CD45^{low}$ (белок, экспрессирующийся на поверхности всех гемопоэтических клеток). Эти эритромиелоидные клетки происходят из гематогенного эндотелия капилляров желточного мешка и далее в процессе развития заселяют эмбриональную печень. Макрофаги, берущие начало из прогениторных клеток стенки желточного мешка похожи по ряду функциональных свойств и экспрессии молекулярных маркеров на макрофаги из первого поколения прогениторных клеток, но отличаются тем, что их созревание проходит через стадию моноцитарных клеток. [Gomez Perdiguero и др., 2015a;

Hoeffel и др., 2015a; Hoeffel, Ginhoux, 2018; Perdiguero, Geissmann, 2016]. Третье поколение кроветворных клеток - это популяции, положительные по маркерам c-Kit и CD45, которые берут начало из эндотелия аорто-гонадомезонефральной области и впоследствии заселяют красный костный мозг и печень зародыша. Макрофагами из третьего поколения кроветворных клеток заселены все органы эмбриона, кроме микроглии центральной нервной системы [Hoeffel, Ginhoux, 2015; Hoeffel, Ginhoux, 2018]. В эмбриогенезе в зародышевых тканях и органах преимущественно содержатся макрофаги второго и третьего поколения клеток-предшественников. В постнатальном периоде в большинстве органов и тканей доля макрофагов, происходящих из эритромиелоидных клеток желточного мешка, постепенно снижается, а доля макрофагов из гемопоэтических клеток третьего поколения, наоборот, возрастает [Chazaud, 2014; Kopf, Schneider, Nobs, 2015; Perdiguero, Geissmann, 2016]. Микроглия центральной нервной системы заселена только макрофагами из первого поколения гемопоэтических клеток-предшественников. Тканевые резидентные макрофаги печени (клетки Купфера) и эпидермальные макрофаги (клетки Лангерганса - резидентные макрофаги кожи) – это клетки, происходящие из второго поколения эритромиелоидных кроветворных клеток [Gomez Perdiguero и др., 2015a; Perdiguero, Geissmann, 2016].

Показано, что макрофаги костномозгового происхождения в физиологических условиях составляют менее десяти процентов всех макрофагов головного мозга и печени. Доля макрофагов костномозгового происхождения в популяции резидентных макрофагов лёгких, сердца и селезёнки также невелика, но по мере старения организма она значительно увеличивается. При этом именно макрофаги костномозгового происхождения преобладают в составе соединительной ткани слизистой оболочки кишечника [Perdiguero, Geissmann, 2016] (Рисунок 1).

Показано, что макрофаги, находящиеся в дерме кожи и соединительной ткани слизистых оболочек кишечника, имеющие эмбриональное происхождение из второго поколения эритромиелоидных кроветворных клеток, полностью замещаются макрофагами костномозгового происхождения в процессе развития

[Chazaud, 2014; Epelman, Lavine, Randolph, 2014]. Закономерности распределения макрофагов разных генераций в организме на сегодняшний день малоизучены.

Источник происхождения органных макрофагов отражается на их функциях, свойствах и на особенностях регуляции ими физиологических и патологических процессов. Существуют значительные различия в физиологии и функциях резидентных самоподдерживающихся макрофагов печени – клеток Купфера, имеющих эмбриональное происхождение и макрофагов костномозгового происхождения, производных моноцитов крови. В печени содержится более девяноста пяти процентов всех тканевых макрофагов организма [Bilzer, Roggel, Gerbes, 2006]. Не смотря на это, на моделях острого повреждения органа парацетамолом или четырёххлористым углеродом продемонстрировано, что в печень после травмирующего воздействия активно начинают мигрировать макрофаги костномозгового происхождения [Guillot, Tacke, 2019; Li и др., 2017; Michalopoulos, 2014]. Макрофаги костномозгового происхождения, мигрировавшие в печень после модели повреждения, остаются доминирующей популяцией в органе только в течение 72 часов, а уже через 96 часов они полностью элиминируются, а на их место приходят тканевые резидентные макрофаги, которые восстановили свою численность за счет пролиферации *in situ* [Dou и др., 2020; You и др., 2013]. На моделях искусственного истощения популяции тканевых резидентных макрофагов и состояниях, препятствующих миграции в печень макрофагов костномозгового происхождения, показано, что подобные нарушения вызывают замедление процесса регенерации органа [You и др., 2013; Zigmond и др., 2014]. Очевидно, что оба типа макрофагов как тканевые самоподдерживающиеся макрофаги печени так мигрировавшие из крови макрофаги – производные моноцитов крови участвуют в процессах восстановления печени, но при этом точная роль каждой из этих популяций макрофагов остается изученной не до конца.

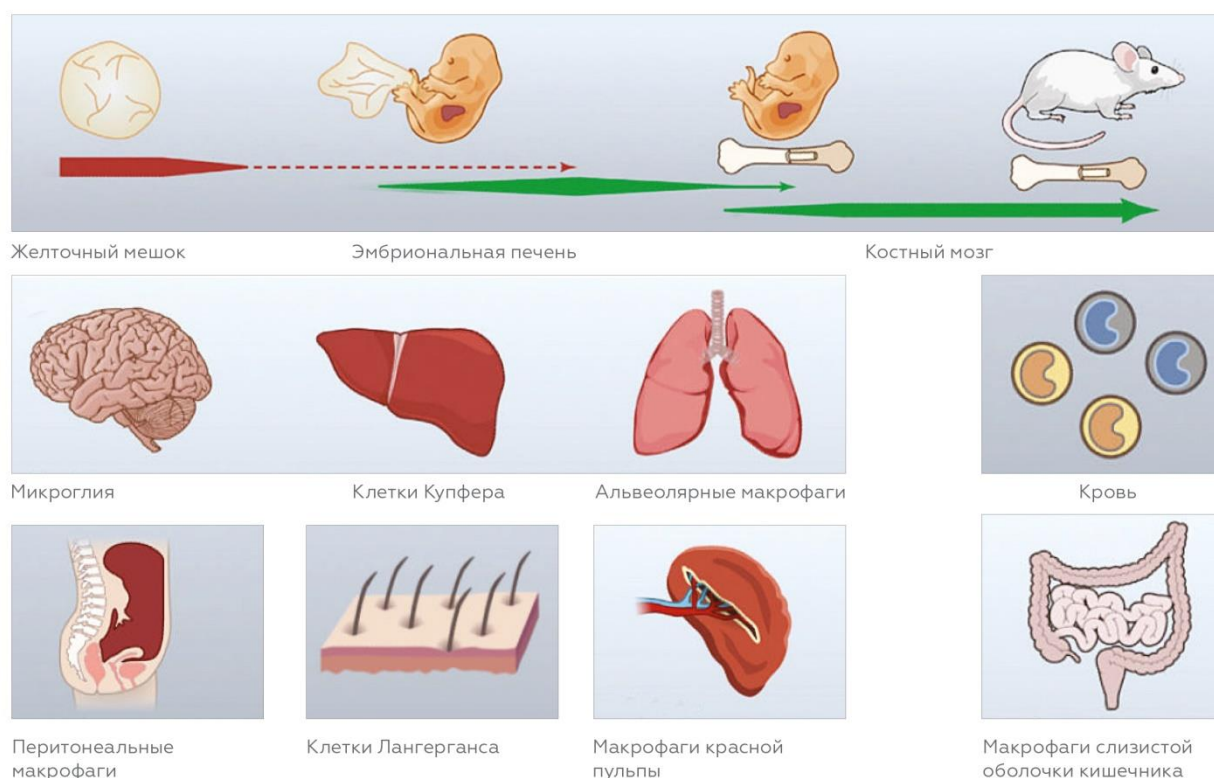


Рисунок 1. Схема распределения макрофагов разного происхождения в тканях и органах взрослых млекопитающих [Epelman, Lavine, Randolph, 2014].

2.2. Характеристика макрофагов эмбрионального происхождения на примере резидентных макрофагов печени – клеток Купфера

Все резидентные макрофаги в процессе развития организма приобретают тканеспецифические характеристики и поддерживают свою численность за счёт пролиферации *in situ*. Наиболее ярким примером долгоживущих тканевых макрофагов являются резидентные макрофаги печени - клетки Купфера и клетки микроглии центральной нервной системы [Guilliams, Scott, 2017; Halder, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2018]. Резидентные макрофаги печени - клетки Купфера являются одним из ключевых клеточных типов, которые регулируют гомеостаз органа, а так же физиологическую и репаративную регенерацию [Das и др., 2015; Li и др., 2017; Michalopoulos, 2014]. Клетки Купфера – звездчатые макрофаги печени - названы в честь немецкого анатома, гистолога и эмбриолога Карла

Вильгельма Купфера, впервые описавшего эти клетки в 1876 году. Карл Купфер впервые обнаружил клетки звездчатой формы, расположенные вблизи синусоидных капилляров печени при импрегнации гистологических срезов хлоридом золота [Haubrich, 2004]. Только в 1898 году польским патологом Тадеушом Бровецем клетки Купфера были описаны как самостоятельные тканевые резидентные макрофаги печени. Клетки Купфера наряду с эндотелиоцитами входят в состав стенки синусоидных капилляров каждой печеночной дольки [Murphy, Weaver, 2018; Ross, Pawlina, 2010] (Рисунок 2).

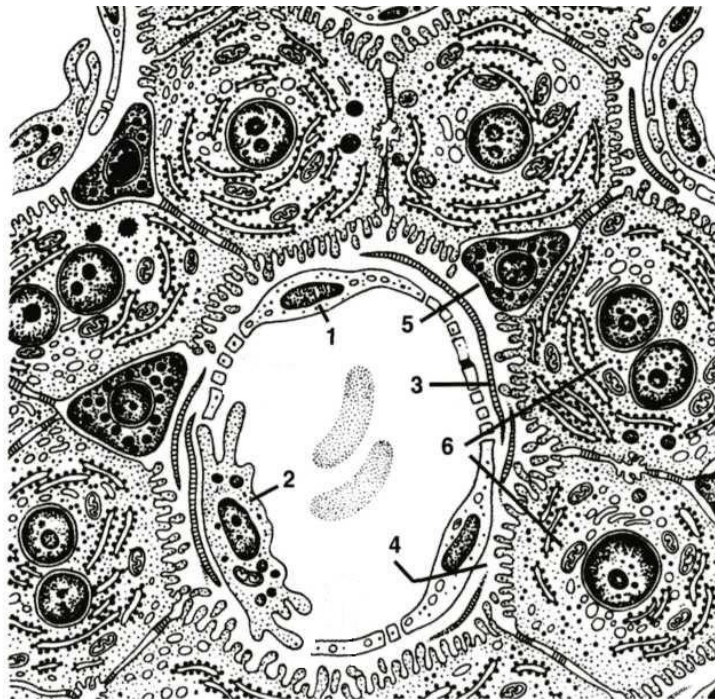


Рисунок 2. Ультрастроение синусоидного капилляра печени. 1 – эндотелиоцит; 2 – клетка Купфера; 3 – базальная мембрана; 4 – пространство Диссе; 5 – клетка Ито; 6 – гепатоциты [Ross, Pawlina, 2010].

Согласно современным представлениям об источниках развития тканевых резидентных макрофагов, макрофаги печени являются самоподдерживающейся клеточной популяцией, ведущей происхождение из гемопоэтических клеток желточного мешка [Chazaud, 2014; Epelman, Lavine, Randolph, 2014]. Причины того, что в печени сохранились потомки первых гемопоэтических клеток, не

совсем ясны. Источник происхождения тканевых резидентных макрофагов печени, естественно, отражается на их свойствах, а также на закономерностях протекания физиологических и патологических процессов в органе.

Помимо макрофагов, развивающихся из гемопоэтических клеток желточного мешка, в печени млекопитающих присутствуют также макрофаги костномозгового происхождения, но эта популяция клеток крайне мала. Известно, что в норме в печени доминантная популяция макрофагов представлена клетками Купфера, а доля макрофагов костномозгового происхождения составляет менее пяти процентов [Zigmond и др., 2014].

Работ, описывающих онтогенез резидентных макрофагов печени крыс, крайне мало. Однако, на основании уже имеющихся данных можно заключить, что вклад гемопоэтических прогениторных клеток желточного мешка в развитие клеток Купфера у крыс сходен с таковым при образовании тканевых макрофагов печени мышей [Takahashi, Naito, 1993]. Возможно, такая программа развития тканевых резидентных макрофагов печени является эволюционно консервативной, так как она оказалась похожей у амфибий и, вероятно, у человека [Godin, Cumanò, 2002; Röszer, 2018]. В печени практически полностью отсутствуют макрофаги костномозгового происхождения [Michalopoulos, 2014; Pridans и др., 2018], а около 90 - 95 процентов при нормальных физиологических условиях составляют макрофаги эмбрионального происхождения [Liaskou, Wilson, Oo, 2012].

Макрофаги печени млекопитающих в постнатальном периоде разнообразны по размерам и локализации. В литературе описаны два типа резидентных макрофагов печени в зависимости от этих характеристик. Первый тип – крупные клетки, расположенные вблизи синусоидных капилляров, второй тип – клетки небольшого размера, находящиеся вокруг центральных вен и портальных трактов. Оба типа клеток экспрессируют пан-макрофагальный маркер гликопротеин CD68 на высоком уровне, но при этом они различаются экспрессией трансмембранного белка-регулятора острой фазы воспаления маркера CD163. Белок CD163 экспрессируется на высоком уровне только на крупных клетках Купфера,

количество которых составляет девяносто процентов от всех макрофагов печени [Armbrust, Ramadori, 1996; He и др., 2009]. Мелкие клетки Купфера, на поверхности которых маркер CD163 не представлен, составляют лишь около десяти процентов от всей популяции тканевых резидентных макрофагов печени, что соответствует доле макрофагов костномозгового происхождения [Chazaud, 2014; Zigmond и др., 2014]. Эти литературные данные позволяют рассматривать мелкие клетки Купфера как макрофаги костномозгового происхождения. Как крупные так и мелкие макрофаги печени участвуют в процессах регенерации органа после его повреждения, однако вклад каждой из популяций значительно колеблется в зависимости от типа повреждения и стадии репаративного процесса [Chazaud, 2014].

Интегральный трансмембранный белок CD68 используется для идентификации макрофагов крысы с 1985 года. C.D.Dijkstra с соавторами показали высокую и специфичную экспрессию белков ED1 (позднее он был определен как CD68), ED2 и ED3 в мембранах и цитоплазме клеток, относящихся к популяции моноклеарных фагоцитов. Никакие другие типы клеток не экспрессировали описанные белки. Позднее было показано, что белок ED1 экспрессируется преимущественно на лизосомальной мембране и незначительно на поверхности клеток и является цитоплазматическим маркером тканевых и свободно циркулирующих в крови фагоцитирующих клеток. Белки ED2 и ED3 распознавали мембранные антигены тканевых макрофагов в соответствии с характерной локализацией в лимфоидных органах [Dijkstra и др., 1985].

В настоящее время трансмембранный гликопротеид из семейства белков лизосомальной мембраны LAMP - CD68 считается общим пан-макрофагальным маркером, даже несмотря на то, что в незначительных количествах он экспрессируется в других типах клеток, например в эндотелиальных клетках, фибробластах и лейкоцитах [Gottfried и др., 2008]. Белок CD68 регулирует фагоцитарную активность макрофагов, принимая участие во внутриклеточном лизосомальном метаболизме и во внеклеточных взаимодействиях клеток с патогенами. Он участвует в клеточной адгезии, связываясь с селектинами и

лектинами и позволяет макрофагам заякориваться в определённых участках ткани. [Holness, Simmons, 1993; Sanchez-Madrid и др., 1983; Schittenhelm, Hilkens, Morrison, 2017].

Для идентификации тканевых макрофагов эмбрионального происхождения мыши в 1981 году был предложен свой маркер - F4/80, отсутствующий на поверхности макрофагов крысы и человека. Белок F4/80, известный также как Ly71 и EMR1, является частью семейства EGF-TM7. Он представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 160 кДа. Белок F4/80 на высоком уровне экспрессируется в различных макрофагах, включая резидентные макрофаги печени, макрофаги красной пульпы селезенки, микроглию, макрофаги слизистой оболочки кишечника, клетки Лангерганса кожи, а также макрофаги соединительной ткани, сердца, почек, репродуктивной и нейроэндокринной систем [Austyn, Gordon, 1981; McKnight и др., 1996; Schaller и др., 2002].

Исследования показывают, что клетки Купфера мыши имеют иммунофенотип $F4/80^{+}CD68^{+}CD11b^{-}$, крысы - $CD68^{+}CD11b^{-}$, в то время как инфильтрирующие макрофаги костномозгового происхождения, мигрирующие в орган после повреждения, являются $F4/80^{+}CD68^{+}CD11b^{+}$ и $CD68^{+}CD11b^{+}$ соответственно [Behnke и др., 2018; Halder, Murphy, 2014; Movita и др., 2012; Zigmond и др., 2014].

Данные, представленные в литературе по другим видам млекопитающих крайне скудны и неоднозначны. Известно, что для идентификации клеток Купфера человека предложено использовать маркер CD163L [Gonzalez-Dominguez и др., 2015].

2.3. Характеристика макрофагов костномозгового происхождения

Количество высокоспецифичных маркеров, используемых для идентификации, визуализации и детекции популяции макрофагов костномозгового происхождения значительно больше, чем для описания

резидентных макрофагов эмбрионального происхождения [Ju, C.; Tacke, F., 2016]. Самые часто встречающиеся в литературе маркеры макрофагов костномозгового происхождения – это белки семейства лимфоцитарных антигенов Ly6C и CX3CR1 [Chazaud, 2014; Graubardt и др., 2017; Perdiguero, Geissmann, 2016]. Подробнее всего популяции костномозговых макрофагов – производных моноцитов изучены у человека и мыши [Geissmann, Jung, Littman, 2003; Italiani, Boraschi, 2014a; Jakubzick, Randolph, Henson, 2017]. В крови этих видов и ряда других млекопитающих обнаружено несколько субпопуляций моноцитарных макрофагов [Ziegler-Heitbrock, 2014].

Предшественниками костномозговых макрофагов человека являются моноциты крови. На основании паттернов экспрессии CD16 (Fc рецептор – FcγRIII) и CD14 (рецептор LPS) выделяют три основных подмножества моноцитов человека: классические $CD14^{++}CD16^{-}$, промежуточные (или воспалительные) $CD14^{++}CD16^{+}$ и неклассические $CD14^{+}CD16^{++}$ моноциты. Эти подмножества существенно различаются по экспрессии хемокиновых рецепторов, фагоцитарной активности и распределению в тканях при воспалительном процессе и в физиологических условиях. По аналогии с основными подмножествами моноцитов человека и мыши (классические Ly6C-high и неклассические Ly6C-low) [Gordon, Taylor, 2005; Jakubzick и др., 2013] моноциты крысы по уровню экспрессии специфических маркеров и хемокиновых рецепторов также делят на два подтипа, но роль в иммунных реакциях и степень участия в воспалительных процессах каждой из субпопуляций моноцитов крысы изучена крайне поверхностно. Основным маркером моноцитов крысы является трансмембранный гликопротеин CD43 – лейкосиалин, играющий важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке и апоптозе [Ahuja, Miller, Howell, 1995; Howell и др., 1994]. По уровню экспрессии этого белка в популяции моноцитов крысы выделяют $CD43^{high}$ и $CD43^{low}$ клеточные подтипы. Популяция классических моноцитов крысы представлена $CD43^{low}$ клетками, количество которых составляет по разным данным от десяти до двадцати процентов. Популяция неклассических моноцитов крысы является мажорной, она

представлена CD43^{high} клетками и составляет девяносто процентов от всех моноцитов. Клетки CD43^{low} в отличие от CD43^{high} экспрессируют рецептор к мембранному белку костимулятору пролиферации Т-лимфоцитов - CD200 на высоком уровне. За счет выраженной экспрессии рецептора CD200R, регулирующего продукцию TNFα и iNOs, популяцию CD43^{low} клеток принято считать классической провоспалительной, по аналогии с человеческими CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитами. Так же CD43^{low} моноциты высоко экспрессируют рецептор хемокина 7 (CCR7), в отличие от CD43^{high} клеток, на поверхности которых данный рецептор отсутствует [Strauss-Ayali, Conrad, Mosser, 2007; Yona и др., 2013]. Таким образом, фенотип классической минорной (10-20%) популяции моноцитов крысы определен как CD43^{low}CD11c⁻CX3CL1⁻CCR2⁺CD200R⁺CCR7⁺, фенотип мажорной (до 90%) неклассической популяции - CD43^{high}CD11c⁺CX3CL1⁺CCR2⁻CD200R⁻CCR7⁻. Взаимосвязь и участие каждой из субпопуляций моноцитов в процессах воспаления, репарации и поддержании гомеостаза изучены весьма поверхностно [Barnett-Vanes и др., 2016; Grau и др., 2000].

Большая часть работ по изучению онтогенеза макрофагов млекопитающих проводилась на лабораторных мышах. Зрелые постнатальные макрофаги костномозгового происхождения у мышей имеют поверхностный маркер – белок Ly6C, который отсутствует на поверхности резидентных макрофагов эмбрионального происхождения [You и др., 2013; Zigmond и др., 2014]. У здоровых мышей на основе экспрессии лимфоцитарного антигена Ly6C было описано две популяции моноцитарных макрофагов [Graubardt и др., 2017; Yona и др., 2013]. Итак, циркулирующие в крови мышей макрофаги костномозгового происхождения различаются по экспрессии Ly6C (ранее он назывался Gr1) и по экспрессии ряда хемокиновых рецепторов [Ingersoll и др., 2010]. Таким образом, циркулирующие в крови мышей моноциты условно можно поделить на две группы: CX3CR1^{lo}CD62L⁺CCR2⁺Gr1(Ly6C/G)^{high} популяция юных клеток, и CX3CR1^{hi}CCR2⁻Gr1^{low} - зрелые клетки, которые обладают способностью дифференцироваться в сторону истинных макрофагов или дендритных клеток *in*

vivo. По аналогии моноциты крови человека также делят на две подобные группы: клетки, несущие маркеры $CX3CR1^{lo}CD14^{+}CD11b^{hi}CD11c^{+}CD62L^{+}CD16^{-}$ и $CX3CR1^{hi}CD14^{lo}CD16^{+}CD11b^{+}CD11c^{hi}$ [Geissmann, Jung, Littman, 2003; Ingersoll и др., 2010; Schulz и др., 2012].

Постнатальные макрофаги костномозгового происхождения крыс экспрессируют белковые маркеры CX3CR1 (рецептор фракталкина CX3CL1) и интегрин альфа-M CD11b. Белок Ly6C на поверхности костномозговых макрофагов у крыс не обнаруживается [Zigmond и др., 2014]. Интегрин альфа-M CD11b чаще всего используется в качестве маркера макрофагов костномозгового происхождения [Ikarashi и др., 2013; Kinoshita и др., 2010; Nishiyama и др., 2015]. В эксперименте показано, что почти все макрофаги (до 98%), выделенные из костного мозга, экспрессируют маркер CD11b на очень высоком уровне. Интегрин CD11b является специфическим маркером для макрофагов – производных моноцитов крови крыс. Таким образом, для костномозговых макрофагов в литературе описаны следующие иммунофенотипы: $CD68^{+}CD11b^{+}$, $CX3CR1^{hi}CD11b^{+}$, $CD68^{+}CD11b^{+}CX3CR1^{+}$ - для крыс, и $CD68^{+}Ly6C^{+}CX3CR1^{hi}$, $F4/80^{+}CD11b^{+}$, $F4/80^{+}Ly6C^{+}CX3CR1^{-}$ - для мышей [Halдар, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2018; Perdiguero, Geissmann, 2016; Zigmond и др., 2014].

2.4. Макрофаги костномозгового происхождения в популяции макрофагов печени

Макрофаги костномозгового происхождения - производные моноцитов крови в печени представляют минорную популяцию, на долю которых приходится около десяти процентов всех макрофагов печени [Chazaud, 2014; Kinoshita и др., 2010; Zigmond и др., 2014]. В зависимости от того какой маркер исследователи применяют для детекции макрофагов костномозгового происхождения, количество этих клеток в печени мышей по данным одних авторов составляет около семи процентов [Nishiyama и др., 2015], по данным

других - от двух до пяти процентов всех макрофагов органа [Gomez Perdiguero и др., 2015a; Perdiguero, Geissmann, 2016]. Резидентные макрофаги печени мышей имеют фенотип $Ly6C^-CX3CR1^{low}$, тогда как при воспалении в печень мигрируют костномозговые макрофагами с фенотипом $Ly6C^+CX3CR1^{hi}$ [Graubardt и др., 2017; Yin и др., 2011].

Источником минорной популяции макрофагов костномозгового происхождения в печени мышей являются моноциты крови, предшественниками которых принято считать клетки с фенотипом $CX3CR1^+ CD117^+ Lin^-$ [Fogg и др., 2006]. Основные функции макрофагов костномозгового происхождения определяются их способностью быстро активироваться и депонироваться в органе после практически любого повреждения, где они адаптируются к микроокружению, функционально его изменяя. Таким образом, они обладают выраженной пластичностью, которая определяет их как одну из ведущих клеточных популяций, участвующих в реализации иммунного ответа.

Макрофаги – производные моноцитов, локализованные в органе, можно разделить на две группы по экспрессии лимфоцитарного антигена $Ly6C$. Положительные по маркеру $Ly6C$ макрофаги костномозгового происхождения, находящиеся в ткани – это активные провоспалительные клетки, которые, в первую очередь, ответственны за развитие острой фазы воспаления. Макрофаги, которые не экспрессируют маркер $Ly6C$ на своей поверхности, являются предшественниками дендритных клеток [Varol и др., 2007]. В норме макрофаги костномозгового происхождения отличаются от самообновляющихся тканевых резидентных макрофагов эмбрионального происхождения продолжительностью жизни, которая, по данным литературы, составляет два дня для клеток $Ly6C^{lo}$ и двадцать часов для $Ly6C^{hi}$ [Hashimoto и др., 2013]. Также, согласно литературным данным, клетки, положительные по маркеру $Ly6C$, на высоком уровне экспрессируют муциновый рецепторный - белок HAVCR2, гены лектинов типа C - *CLEC4d*, *CLEC4e* и *CLEC5a*, молекулы клеточной адгезии, специфичные для дендритных клеток - ICAM3 (рецептор для интегрин альфа-D отвечающий за инициацию иммунного ответа) и другие неинтегрированные изоформы молекул

межклеточной адгезии дендритных клеток, например CD209a и CD93 [Zigmond и др., 2014].

По сравнению с клетками Купфера, имеющими звездчатую форму, макрофаги костномозгового происхождения – это клетки шаровидной формы, имеющие значительно меньше цитоплазматических отростков [Mossanen и др., 2016]. Костномозговые макрофаги мигрируют из общего кровотока в печень в момент активации toll-like рецепторов резидентных макрофагов печени и жирозапасающих клеток Ито. Этот процесс сопровождается повышением уровня хемокинов CXCL1 и CCL2 и лигандов к ним [Baeck и др., 2012; Karlin Raja Karlmark Ralf Weiskirchen Henning W. Zimmermann Nikolaus Gassler Florent Ginhoux Christian Weber, ; Roh и др., 2015]. Следовательно, их антагонисты CCR2 и CCR5 приводят к уменьшению числа провоспалительных костномозговых макрофагов в печени. [Baeck и др., 2012; Chen, 2019; Krenkel и др., 2018; Mossanen и др., 2016; Puengel и др., 2017].

После острого поражения или травмы печени, когда популяция тканевых резидентных макрофагов истощена, костномозговые макрофаги способны восстановить пул резидентных макрофагов органа. На модели острого поражения печени мышей дифтерийным токсином было показано, что костномозговые макрофаги почти полностью восполнили популяцию резидентных макрофагов и дифференцировались до зрелых функционирующих и самообновляющихся клеток Купфера в течение одного месяца [Scott и др., 2016]. Было также продемонстрировано, что костномозговые макрофаги заселяют печень после гибели резидентных макрофагов, вызванной воздействием *Listeria monocytogenes* [Blériot и др., 2015], радиации [Beattie и др., 2016] или клодронатом. [David и др., 2016]. По данным других исследований, после уменьшения количества резидентных макрофагов, вызванного острым повреждением печени парацетамолом оставшиеся клетки Купфера начинали пролиферировать для восстановления пула резидентных макрофагов, а пришедшие в орган костномозговые макрофаги проявляли активность лишь на ранней стадии повреждения [Zigmond и др., 2014].

2.5. Классификация макрофагов по функциональным свойствам

Макрофаги являются важными участниками иммунного ответа. Показано, что их функциональное состояние влияет и на другие звенья иммунной системы. Концепция классической и альтернативной активации макрофагов (M1 и M2 поляризация) аналогична концепции функциональных состояний Т-хелперных лимфоцитов. В 1986 Mosmann, Coffman и соавторами была выдвинута гипотеза о том, что Т-хелперные клетки после их активации можно разделить на две группы по типу секретируемых цитокинов и функциональным свойствам [Mosmann и др., 1986]. Согласно выдвинутой гипотезе, различают Th1 – лимфоциты, способствующие развитию клеточного иммунного ответа, активирующие макрофаги; и Th2 – клетки, способствующие развитию гуморального иммунного ответа и активирующие В-лимфоциты [Coffman, 2006]. Взаимодействия макрофагов и активированных Т- и В-лимфоцитов регулирует иммунный ответ. Роль Th1-производного IFN- γ в клеточном опосредованном иммунитете к инфекции и интерлейкину-4 (IL-4) в гуморальном иммунном ответе (Th2) дали начало аналогичной концепции для макрофагов M1 и M2. [Doyle и др., 1994; Stein и др., 1992].

Макрофаги - пластичная популяция клеток, которые обладают способностью «переключаться» с одного фенотипа на другой [Mantovani и др., 2004; Mantovani и др., 2013]. Поляризация макрофагов - это процесс, при котором клетки создают специфический фенотип и функциональную реакцию в ответ на условия и факторы микроокружения в конкретный момент времени. Локальная цитокиновая среда также может ориентировать поляризацию макрофагов. Таким образом, у ряда млекопитающих (человек, мышь, крыса) на основе экспрессии специфических клеточных маркеров и продукции биологически активных веществ и факторов были описаны два функциональных подтипа макрофагов. Были выявлены две основные субпопуляции клеток с различными функциями:

классически активированные или провоспалительные M1-макрофаги и альтернативно активированные, или противовоспалительные M2-макрофаги. [Biswas и др., 2012; Cassetta, Cassol, Poli, 2011; Murray и др., 2014; Murray, 2017; Sica и др., 2015].

Изучая факторы, регулирующие метаболизм аргинина в макрофагах на мышинных моделях, Mills C.D. с соавторами [Mills и др., 2000] обнаружили, что макрофаги, активированные Th1-и Th2-лимфоцитами, различаются по способности реагировать на IFN- γ или липополисахарид (LPS) или одновременно на IFN- γ и LPS и определили важное метаболическое различие в поведении клеток: часть макрофагов вырабатывает токсичный оксид азота (NO), а остальные клетки синтезируют трофические полиамины. Авторы предложили отразить эту особенность, разделив макрофаги на два физиологических подтипа - M1 и M2, основываясь на предрасположенности макрофагов к развитию специфических фенотипов. Предложенная классификация основана на ингибировании индуцибельной синтазы оксида азота (iNOs) и не зависит от влияния T- и B-клеток на макрофаги [Mills и др., 2000].

2.6. Макрофаги, активированные по классическому провоспалительному M1 фенотипу

Основными активаторами поляризации макрофагов по классическому провоспалительному M1 фенотипу являются Th1 цитокины (IFN γ и TNF α); молекулярные комплексы, ассоциированные с патогенами (липпополисахариды, липопроотеины, липотейхоевая кислота); микроорганизмы; цитомегаловирус и белки теплового шока. [Bashir и др., 2016; Murray, 2017]. M1 макрофаги являются активными продуцентами эффекторных молекул (активных форм кислорода и метаболитов азота), провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 и циклооксигеназы-2 (COX-2), а противовоспалительный цитокин IL-10 синтезируется на низком уровне. Макрофаги, поляризованные по M1 пути,

участвуют в удалении патогенов в период инфекционного процесса путем активации НАДФН-оксидазной системы и последующей генерации активных форм кислорода. Таким образом, макрофаги, поляризованные в M1 направлении, обладают мощной антимикробной активностью, а повреждение тканей, опосредованное активными формами кислорода, замедляет и ослабляет регенерацию тканей и заживление ран [Bashir и др., 2016; Biswas и др., 2012; Biswas, Mantovani, 2012; Cassetta, Cassol, Poli, 2011; Cassol и др., 2010; Mantovani и др., 2004; Murray, 2017; Sica, Mantovani, 2012; Wang, Liang, Zen, 2014].

2.7. Макрофаги, активированные по альтернативному противовоспалительному M2 фенотипу

Макрофаги поляризуются по M2 пути Th2-цитокинами: IL-4 и IL-13 через активацию STAT6 и рецептор к IL-4 (IL-4Ra). Помимо IL-4 и IL-13, другие цитокины, такие как IL-10, также могут вызывать поляризацию в M2 направлении через активацию STAT3 и рецептор к IL-10 (IL-10R) [Porta et al., 2015; Wang et al., 2014]. IL-33, входящий в группу Th2-ассоциированных цитокинов, усиливает IL-13-индуцированную поляризацию фенотипа M2, характеризующуюся повышением экспрессии аргиназы-1 (Arg1), хемокинов CCL17 и CCL24, которые вызывают эозинофилию легких и воспаление дыхательных путей [Kurowska-Stolarska и др., 2009]. IL-21 является еще одним Th2-ассоциированным цитокином, который также способен активировать поляризацию в M2 направлении. Альтернативная форма активации M2 также может произойти в результате действия TGF β , витамина D3, глюкокортикоидов и др. молекул [Beschinn, Baetselier De, Ginderachter Van, 2013; Chua и др., 2013; Tundup, Srivastava, Harn Jr., 2012]. Макрофаги, активированные по пути M2 фенотипа, имеют противовоспалительный цитокиновый профиль, который характеризуется низкой продукцией IL-12 и высокой продукцией IL-10 и TGF- β .

Функционально макрофаги, активированные по M2 фенотипу, обладают активной способностью к фагоцитозу, поглощают клеточный дебрис и апоптотические элементы. За счет синтеза факторов роста VEGF, EGF, PDGF и IL-10 способствуют восстановлению тканей и заживлению ран, а также обладают профибротическими свойствами, принимают участие в Th2-реакциях и обладают противопаразитарной активностью, купируют воспаление, участвуют в ремоделировании клеточного матрикса. [Braga, Agudelo, Camara, 2015; Jetten и др., 2014; Kurowska-Stolarska и др., 2009; Murray, Wynn, 2011a; Wang, Liang, Zen, 2014]. У M2-макрофагов отмечены проангиогенные и иммунорегуляторные свойства, они также участвуют в онкогенезе и прогрессировании опухолевого роста [Belgiovine и др., 2016; Porta и др., 2015; Qian, Pollard, 2010; Ruffell, Affara, Coussens, 2012; Ruffell, Coussens, 2015; Schultze, Schmidt, 2015]. M2-макрофаги экспрессируют большое количество рецепторов галактозного типа, метаболизм аргинина у них сдвинут в сторону выработки орнитина и полиаминов. Для защиты тканей от повреждения хроническая воспалительная реакция ингибируется регуляторными механизмами, обусловленными противовоспалительной функцией макрофагов, активированных по пути M2.

Концепция M1/M2 континуума макрофагов допускает существование их фенотипических подмножеств [Chistiakov и др., 2015]. В зависимости от активирующего агента M2 макрофаги могут быть разделены на четыре подтипа: M2a, M2b, M2c и M2d [Martinez и др., 2008]. Активация M2a фенотипа происходит под действием IL-4 и IL-13 и сопровождается повышенной экспрессией маркера CD206 на клетках, а также продукцией IL-1 и рецептора к нему. Фенотип M2b может быть активирован стимуляцией иммунными комплексами и агонистами TLR. Макрофаги M2b продуцируют как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины IL-10, IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Активация макрофагов по пути M2c индуцируется TGF- β , M2c фенотип активирует противовоспалительную активность по отношению к апоптотическим клеткам, сопровождается высоким уровнем продукции IL-10 [Martinez и др., 2008; Zizzo и др., 2012].

Четвертый подтип макрофагов, активированных по пути M2, M2d, индуцируется агонистами TLR через аденозиновый рецептор. Активация аденозинового рецептора сопровождается подавлением продукции провоспалительных цитокинов и стимуляцией секреции противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IL-12), а также сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), тем самым обеспечивая проангиогенные свойства (ангиогенез и неоангиогенез). Макрофаги M2d секретируют цитокины и компоненты внеклеточного матрикса, протеазы (MMP-2, MMP-10, MMP-12), лиганды рецепторов семейства EGFR, тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), которые поддерживают прогрессию опухоли и увеличивают ее злокачественный потенциал. Поэтому в литературе макрофаги, активированные по M2d фенотипу, называют макрофагами, ассоциированными с опухолью (TAM - tumor associated macrophages) [Ferrante и др., 2013; Haskó и др., 2007; Pinhal-Enfield и др., 2003].

Биологические и физиологические особенности разных фенотипических подтипов макрофагов обобщены в Таблице 1 [Duluc и др., 2007; Röszer, 2018; Shapouri-Moghaddam и др., 2018].

Таблица 1. Биологические и физиологические особенности разных фенотипических подтипов макрофагов [Duluc и др., 2007; Röszer, 2018; Shapouri-Moghaddam и др., 2018].

Фенотипический подтип	Факторы активации	Маркеры, экспрессирующиеся на клетках	Цитокины, хемокины и другие секретируемые медиаторы
M1	IFN- γ , LPS	CD68, CD80, CD86, MHC-II, IL-1R, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 ^{low} , IL-12 ^{high} , iNOS ⁺ , SOCS3	TNF, IL-1 beta, IL-6, IL-12, IL-23, CCL10, CCL11, CCL5, CCL8, CCL9, CCL2, CCL3,

			CCL4
M2a	IL-4	CD68, CD206, IL1Ra; IL-1R II, Arg-1, FIZZ1, Ym1/2, CD163, MHC II, CD200R	IL-1R, CCL24 IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22
M2b	иммунные комплексы, лиганды Toll-like рецептора (TLR ligands)	CD68, CD206, IL-10 ^{high} , IL-12 ^{low} MHC II	IL-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL1
M2c	TGF- β	CD68, CD206, TLR-1, TLR-8, Arg-1, CD163	IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, CXCL13 CCR2
M2d	лиганды аденозиновых рецепторов, лиганды Toll-like рецептора (TLR ligands)	CD68, VEGF, IL-12 ^{low} , TNF- α ^{low} , IL-10 ^{high}	IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , CCL5, CXCL10, CXCL16, CCL5, VEGF

В настоящее время M1/M2 концепция часто подвергается критике. В недавнем исследовании Specht и коллеги обнаружили, что даже в отсутствие поляризационных цитокинов в континууме существуют дифференцированные популяции макрофагов [Specht и др., 2019]. Single-cell (изучение транскриптома единичных клеток) анализ выявил наличие как M1, так и M2 сигнатур в макрофагах, что по мнению авторов, указывает на то, что способность к поляризации в провоспалительный или противовоспалительный фенотип может рассматриваться как наследуемое свойство макрофагов. Несмотря на это, M1/M2 концепция является удобным инструментом для характеристики фенотипически полярных состояний клеток.

2.8. Продукция макрофагами цитокинов, хемокинов и факторов роста

Очевидно, что макрофаги в зависимости от их физиологического статуса, M1 или M2 фенотипа имеют различные цитокиновые и хемокиновые профили. Интерлейкины (IL) - это группа цитокинов, отвечающая за активацию и взаимодействие иммунокомпетентных клеток в ходе иммунного ответа. Цитокины также участвуют в индукции молекул адгезии, матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-12), проангиогенных факторов и сигнальных путей, в активации универсального фактора транскрипции, контролирующего экспрессию апоптоза и клеточного цикла - ядерного фактора «каппа-би» (NF- κ B), сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STATs), которые участвуют в инвазии опухоли и ангиогенезе [Fujiwara, Kobayashi, 2005].

Активация макрофагов по фенотипу M1 приводит к индукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 и IL-23, повышению продукции оксида азота (NO), активных форм кислорода и активных форм азота. M1 поляризация стимулирует презентацию антигенов, экспрессию хемокиновых рецепторов CCR1 и CCR5, стимулирование T-хелперных реакций по типам Th1 и Th17 [Fujiwara, Kobayashi, 2005; Porta и др., 2015; Schultze и др., 2015; Schultze, Schmidt, 2015], а также запускает механизм уничтожения патогенов. Хемокиновые профили макрофагов, активированных по разным фенотипам, также отличаются. Макрофаги M1 экспрессируют хемокины CXCL9 и CXCL10, ассоциированные с Th1 клетками. Макрофаги M2 в свою очередь экспрессируют хемокины CCL17, CCL18, CCL22 и CCL24 [Mantovani и др., 2004]. Макрофаги с M1 фенотипом экспрессируют провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1 β и IL-6, способствуя активации цитотоксического адаптивного иммунитета за счет молекул главного комплекса гистосовместимости второго типа (MHC-II) в сочетании с костимулирующими молекулами CD40, CD80, CD86. Кроме того, макрофаги M1 экспрессируют Th1-и

Th17-поляризующие цитокины: IL-12, IL-23, IL-27 и Th1-рекрутирующие хемокины: CXCL9, CXCL10, CXCL11 [Mantovani и др., 2004].

Макрофаги, поляризованные по M2 фенотипу, наоборот, способствуют разрешению воспаления путем переключения экспрессии генов на синтез противовоспалительных молекул. Помимо этого, макрофаги M2 на высоком уровне экспрессируют рецепторы эндоцитоза, в том числе CD163, CD206, CD209, стабилин-1, а также мембранный белок из семейства лектинов типа C - дектин-1. Кроме того, макрофаги с M2 фенотипом рекрутируют Th2-хелперные клетки, T-регуляторные клетки, эозинофилы и базофилы посредством секреции хемокинов CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 [Mantovani и др., 2004; Porta и др., 2015; Schultze и др., 2015; Schultze, Schmidt, 2015].

Воздействие сигналов M1 на макрофаги, активированные по пути M2, или наоборот, вызывают «повторную поляризацию» или «перепрограммирование» дифференцированных макрофагов. Эта особенность является еще одним свидетельством их высокой функциональной пластичности, которая потенциально может быть использована для терапевтических целей.

Функциональные различия разных по происхождению макрофагов изучены весьма поверхностно, и остается неясным, как именно соотносятся макрофаги из разных генераций с макрофагами, классифицированными по типу активации и функциональным свойствам (M1 классически активированные - иммуногенные макрофаги, обладающие провоспалительными свойствами, и M2 альтернативно активированные - толерогенные макрофаги, способствующие разрешению воспаления) [Ju, Tacke, 2016; Martinez, Gordon, 2014a].

Пластичность макрофагов разных генераций (костномозговые и эмбриональные) широко описана в литературе и не вызывает сомнений [Bain и др., 2013; Rivollier и др., 2012]. С точки зрения как фундаментальных, так и клинических исследований наибольший интерес вызывает возможность поляризации макрофагов *in situ* [Murray, Wynn, 2011a], в результате которой они будут отличаться не только фенотипически, но и функционально [Martinez, Gordon, 2014b].

В условиях патологии локальное смещение баланса M1/M2 подтипов макрофагов в сторону M2 противовоспалительного фенотипа значительно улучшает динамику и эффективность процессов репарации и регенерации. Этот эффект был продемонстрирован на моделях кожной раны у мышей с экспериментальным сахарным диабетом [Okizaki и др., 2015], на моделях терапии повреждений спинного мозга [Gensel, Zhang, 2015; Guerrero и др., 2012; Nakajima и др., 2012], в лечении кардиомиопатии костномозговыми макрофагами, активированными по M2 фенотипу [Urbina, Singla, 2014], в лечении инфаркта миокарда у пациентов с сахарным диабетом [Singla и др., 2015; Singla, Johnson, Tavakoli Dargani, 2019], в профилактике атеросклероза на моделях у лабораторных мышей [Singla, Singla, Wang, 2016].

Следует понимать, что изменение баланса M1/M2 подтипов макрофагов может происходить как за счет подавления M1-пути активации, так и за счет стимуляции M2-пути активации, при этом часть макрофагов может оставаться в неактивированном состоянии.

2.9. Использование макрофагов в качестве терапевтических инструментов

Актуальность изучения макрофагов для дальнейшего использования их в качестве мишени или агента для клеточной терапии неоспорима. Также существует перспектива регуляции клеточного гомеостаза при заболеваниях путем изменения фенотипа макрофагов в поврежденных тканях и органах и применения подходов репрограммирования как *in situ*, так и *ex vivo* с последующей обратной трансплантацией модифицированных макрофагов. Активация макрофагов в M1 направлении позволит стимулировать воспаление и гибель клеток при пролиферативных заболеваниях. С другой стороны, увеличивая долю M2 макрофагов, можно стимулировать регенерацию, ангиогенез и ремоделирование внеклеточного матрикса при воспалительных заболеваниях.

Большое количество работ направлено на M1 поляризацию макрофагов с целью усиления их противоопухолевой активности [Curren Smith, 2015; Yin и др., 2019].

В настоящее время макрофаги, ассоциированные с опухолью, представляют наибольший интерес для исследователей ввиду их способности влиять на микроокружение и прогрессию опухоли: они участвуют в трансформации, пролиферации опухолевых клеток, ангиогенезе, инвазии и метастазировании [Worzfeld и др., 2018]. Макрофаги, ассоциированные с опухолью, способны функционировать и как провоспалительные, и как противовоспалительные клетки. Исследования показали, что при некоторых видах рака инфильтрат макрофагов может составлять более пятидесяти процентов массы опухоли [Curren Smith, 2015]. Репрограммирование этих клеток *in situ* направлено на M1 поляризацию макрофагов: M1 поляризованные макрофаги эффективно распознают и уничтожают опухолевые клетки [Liu и др., 2017], что, по мнению ряда исследователей, является привлекательной терапевтической стратегией [Goossens и др., 2019; Yin и др., 2019].

M2-поляризация может найти применение в области трансплантологии, где локализация и предотвращение воспаления обеспечивают лучшую приживаемость имплантата. Разработка методов M2-поляризации и получение стабильной M2-поляризованной линии макрофагов – перспективная область трансплантологии [Brown и др., 2012].

В трансплантологии образование гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) является центральным событием реакции на инородное тело (РИТ) и отличает его от обычного хронического воспаления. Состояние, при котором макрофаги не могут фагоцитировать инородное тело (размером больше 5 мкм), называется «фрустрированный фагоцитоз», вследствие которого макрофаги вынуждены сливаться друг с другом для повышения эффективности фагоцитоза или для того, чтобы избежать апоптоза [Brodbeck и др., 2001]. Противовоспалительные цитокины IL4 и IL13 запускают слияние макрофагов с образованием многоядерных ГКИТ [Helming, Gordon, 2009], в то же время эти цитокины

запускают поляризацию макрофагов в M2 направлении [Riabov и др., 2017]. Макрофаги и ГКИТ являются маркерными клеточными популяциями для оценки биосовместимости материалов. Сейчас общепризнанной точкой зрения является то, что современные биоматериалы должны иметь иммуномодулирующие свойства и обеспечивать снижение количества ГКИТ и M1 провоспалительных макрофагов и напротив, стимулировать регенерацию и ангиогенез за счет поляризации макрофагов в M2 направлении. Введение в состав биоматериалов клеточных культур является, безусловно, эффективным способом создания иммуномодулирующих биоматериалов. Мультипотентные стромальные клетки (МСК), как камбиальные клетки рыхлой волокнистой соединительной ткани, которые технически несложно получить из различных тканей реципиента, являются наиболее изученным способом иммуномодуляции и повышения биосовместимости материалов [Bagratashvili и др., 2016]. МСК обладают выраженными регенераторными свойствами, секретируя противовоспалительные и ангиогенные цитокины и стимулируя поляризацию макрофагов в M2 направлении. В экспериментах на животных уже получены обнадеживающие результаты [Swartzlander и др., 2015]. Клеточная терапия, основанная на использовании изолированной культуры макрофагов, давно рассматривается для использования в клинической практике, в частности, в отношении онкологических заболеваний [Kim, Hematti, 2009]. Увеличение количества M2 макрофагов в области имплантации рассматривают как мишень регуляции РИТ в качестве иммуномодулирующей терапии [Riabov и др., 2017].

Макрофаги являются одними из главных регуляторов тканевого гомеостаза, как в норме, так и при патологических процессах. Получение новых знаний об особенностях пластичности и функциональной активности гетерогенной макрофагальной популяции позволит лучше понять их роль в поддержании и восстановлении гомеостаза, а значит, и разработать новые более эффективные

способы стимуляции репаративных ответов. Бинарная M1/M2 концепция является удобным инструментом для характеристики фенотипически полярных состояний клеток. Высокая функциональная пластичность макрофагов - возможность их активации как *in situ*, так и *ex vivo* по пути провоспалительных M1 или противовоспалительных M2 макрофагов - не вызывает сомнений и потенциально может быть использована в терапевтических целях. Однако функциональные различия разных по происхождению макрофагов (эмбриональных и моноцитарных) изучены весьма поверхностно, и остается неясным, как именно соотносятся макрофаги из разных генераций с макрофагами, классифицированными по типу активации и функциональным свойствам.

Таким образом, проведение комплексного сравнительного исследования молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик макрофагов разного происхождения при полярных функциональных состояниях (M1 и M2) представляет огромный интерес как с точки зрения фундаментальной биологии, так и практической медицины и актуально для дальнейшего использования их как в качестве мишени или агента для клеточной терапии. Возможность поляризации макрофагов *in vitro*, в результате которой они будут отличаться не только фенотипически, но и функционально по своей роли в иммунном ответе, позволит изучить механизмы терапевтической активности данной клеточной популяции, необходимые для обоснования и разработки новых подходов в клеточной трансплантологии.

Изучение вклада макрофагов из разных источников происхождения в процессы регенерации и репарации позволит рассматривать эти клетки в качестве перспективного терапевтического инструмента регуляции клеточного гомеостаза при воспалительных и онкологических заболеваниях человека.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Объект исследования

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.пО81.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 биоэтического комитета ФГБНУ «НИИМЧ», протокол № 20 от 12 марта 2019 года.

3.2. Дизайн исследования

В работе проведено комплексное сравнительное исследование молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик макрофагов эмбрионального происхождения и макрофагов костномозгового происхождения. Макрофаги эмбрионального происхождения получены из интактной печени крыс аутбредного стока Вистар. Макрофаги печени млекопитающих в норме представлены клетками Купфера, имеющими эмбриональное происхождение [Ju, Taske, 2016]. Для получения макрофагов костномозгового происхождения были использованы моноциты крови тех же животных, из которых были выделены и макрофаги печени. В качестве контроля использовали клетки Купфера и макрофаги костномозгового происхождения, которые культивировали без добавления факторов активации поляризации, их условно принимали за М0-макрофаги.

3.3. Получение клеток Купфера

Крысам аутбредного стока Вистар массой тела 250-300 г под эфирным наркозом (Medhimprom, Moscow region, Russia; 0.08 ml per liter of chamber volume) проводили перфузию печени раствором фосфатно-солевого буфера (40-50 мл) через воротную вену. Печень извлекали, дважды промывали раствором Хенкса (ПанЭко, Россия), удаляли оболочки и крупные сосуды, измельчали и инкубировали в 0,05% растворе коллагеназ 1 и 4 типов (ПанЭко, Россия) 20 мин. при 37°C на орбитальном шейкере.

Полученную суспензию клеток пропускали через 100 мкм нейлоновый фильтр (SPL LifeScience, Южная Корея) и дважды отмывали от ферментов в растворе Хенкса (300g, 10 мин., 20°C). Осадок ресуспендировали в 30 мл фосфатно-солевого буфера, осаждали паренхиматозные клетки печени (50g, 3 мин., 20°C) и отбирали непаренхиматозные клетки, оставшиеся в супернатанте. После градиентного центрифугирования (400g, 30 мин., 20°C) на препарате Фиколл (ПанЭко, Россия) получали фракцию клеток Купфера [Zeng и др., 2013; Zhang и др., 2016]. Количество и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США), после чего клетки помещали в питательную среду для дальнейшего культивирования (Рисунок 3).

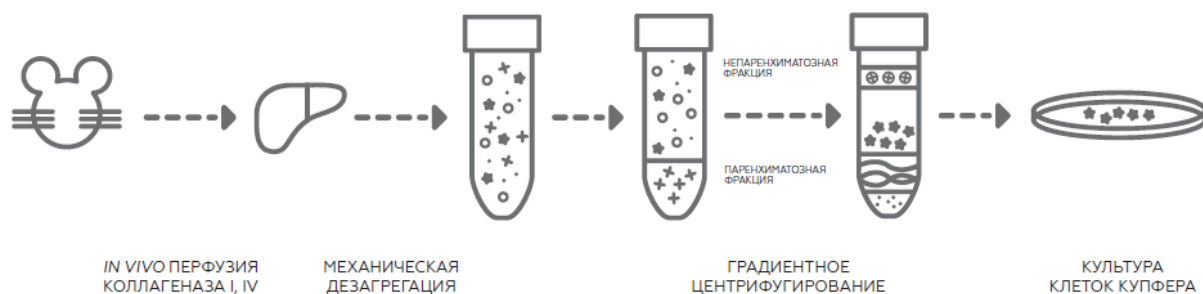


Рисунок 3. Схема метода получения первичной культуры макрофагов эмбрионального происхождения (клетки Купфера) из интактной печени крысы.

3.4. Получение костномозговых макрофагов

У самцов крыс аутбредного стока Вистар массой тела 250-300 г под эфирным наркозом (Medhimprom, Moscow region, Russia; 0.08 ml per liter of chamber volume) производили забор крови путем пункции сердца. Полученную кровь в соотношении 1:1 смешивали с раствором Хенкса (ПанЭко, Россия), содержащим 1000 МЕ/мл гепарина (Синтез, Россия). Методом градиентного центрифугирования (400g, 30 мин., 20°C) на препарате Фиколл (ПанЭко, Россия) получали фракцию моноклеарных клеток [Jaatinen, Laine, 2007], которые дважды отмывали (300g, 20 мин., 20°C) раствором Хенкса. Количество и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США), после чего клетки помещали в питательную среду для дальнейшего культивирования (Рисунок 4).

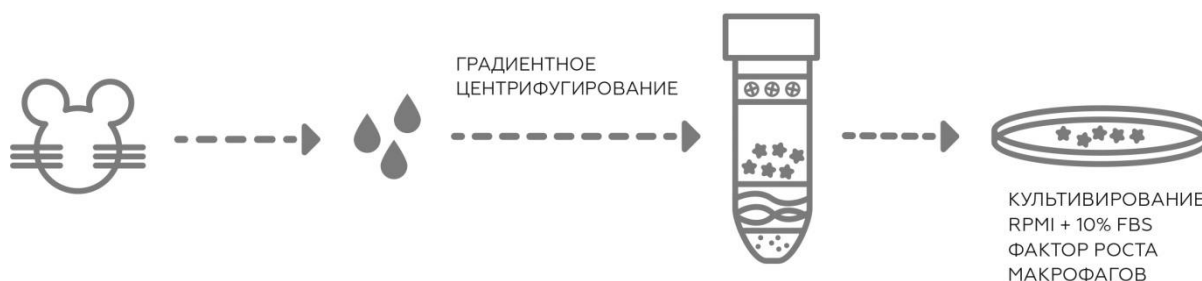


Рисунок 4. Схема метода получения первичной культуры макрофагов костномозгового происхождения.

3.5. Культивирование клеток

Клетки Купфера и моноциты крысы культивировали в условиях CO_2^2 -инкубатора (37°C, 5% CO_2^2) в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). На вторые сутки из культуры убирали клетки,

не прикрепившиеся к пластику. Частичную замену культуральной среды проводили на 4 и 7 сутки.

3.6. Активация клеток *in vitro*

Интактные M0 культуры клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения активировали с помощью коктейлей факторов в направлении классического провоспалительного M1-фенотипа (M1-макрофаги) и альтернативного противовоспалительного M2-фенотипа (M2-макрофаги) (Рисунок 5). *In vitro* модель классически активированных M1 макрофагов получали путем добавления в первичную M0 культуру макрофагов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) на этапе преактивации на 2-ые сутки культивирования и эндотоксина липополисахарида (LPS) - термостабильного компонента клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов в сочетании с IFN- γ на 7 сутки культивирования. Для активации клеток по альтернативному противовоспалительному пути и получения макрофагов с M2-фенотипом в культуральную среду к нативным неактивированным макрофагам добавляли колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF) на этапе преактивации на 2-ые сутки культивирования и смесь интерлейкинов IL4, IL10 и IL13 на 7-ые сутки культивирования (Рисунок 5).

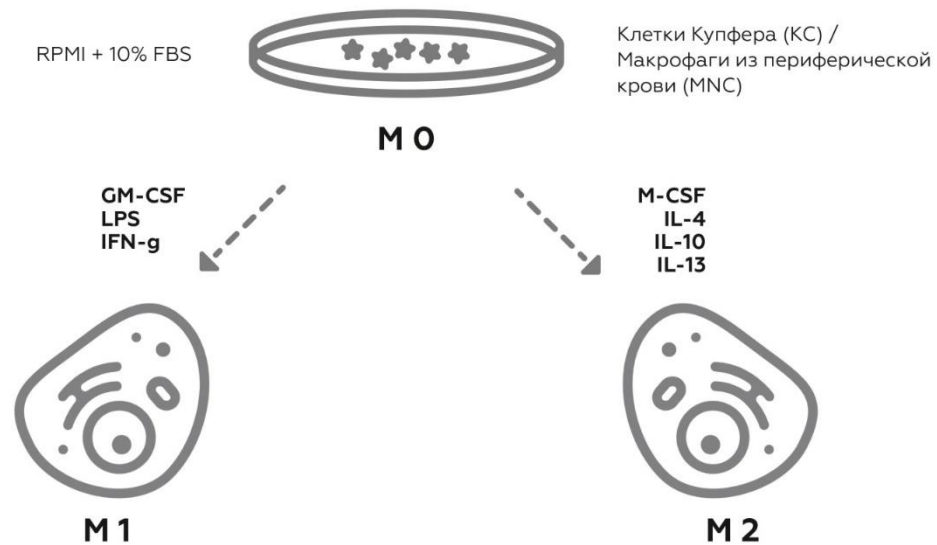


Рисунок 5. Схема активации макрофагов в направлении классического провоспалительного M1-фенотипа и альтернативного противовоспалительного M2-фенотипа.

Активация по M1-фенотипу

Клетки Купфера и макрофаги костномозгового происхождения – моноциты крови крысы культивировали в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 50 нг/мл GM-CSF (Cloud-CloneCorp). На вторые сутки из культуры убирали не прикрепившиеся к пластику клетки. На 4 сутки проводили частичную замену среды. На 7 сутки также проводили частичную замену среды с добавлением 10 нг/мл LPS (Sigma, США) и 40 нг/мл IFN- γ (Cloud-CloneCorp).

Активация по M2-фенотипу

Клетки Купфера и макрофаги костномозгового происхождения – моноциты крови крысы культивировали в среде RPMI (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) с добавлением 100 нг/мл M-CSF (Cloud-CloneCorp). На вторые сутки из культуры убирали неприкрепившиеся к пластику клетки. На 4 сутки проводили частичную замену среды. На 7 сутки также

проводили частичную замену среды с добавлением 20 нг/мл IL4, 20 нг/мл IL10 и 20 нг/мл IL13 (Cloud-CloneCorp).

3.7. Оценка фенотипа макрофагов

Фенотип клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения изучали с помощью иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитофлуориметрии. Маркеры, использованные для оценки фенотипа клеток, представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Маркеры, использованные для оценки фенотипа клеток

CD11/b	интегрин альфа-M, маркер макрофагов костномозгового происхождения
CD68	общий пан-макрофагальный маркер
CD86	мембранный белок костимулятор Т-лимфоцитов, маркер M1 макрофагов
CD163	трансмембранный белок-регулятор острой фазы, опосредующий эндоцитоз гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов, маркер M2 макрофагов
CD206	маннозный рецептор, маркер M2 макрофагов
Arg1	аргиназа 1, маркер M2 макрофагов
iNOs	индуцируемая NO синтаза, маркер M1 макрофагов
Ki67	маркер пролиферации клеток

Иммуноцитохимическое исследование

Фенотип полученных клеток: интактных (M0) и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути тканевых резидентных макрофагов печени и макрофагов костномозгового происхождения оценивали методом иммуноцитохимического окрашивания. Исследование проводили через

24 часа после активации макрофагов. Для оценки экспрессии маркеров, активированных и неактивированных клеток, использовали антитела к CD68 (1:100, Abcam), iNOs (1:100, Abcam), Arg1 (1:100, Abcam), CD206 (1:100, Abcam), Ki67 (1:100, Santa Cruz). Вторые антитела были конъюгированы с FITC (1:200, Abcam). Ядра клеток докрашивали DAPI (0.5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, Sigma-Aldrich, США). Окрашивание нуклеотидспецифичным флуорохромом DAPI (4',6-диамидино-2'-фенилиндо́л, дигидрохлорид) вызывает свечение хроматина в ядрах клеток, специфически связываясь с двунитевыми ДНК. Препараты инкубировали со свежеприготовленным раствором DAPI в течение 30 минут при 37°C, после чего двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (ПанЭко, Россия). Исследование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия). На стеклах подсчитывали общее количество клеток и количество клеток, положительно окрашенных соответствующим антителом. Вычисляли индекс мечения - отношение окрашенных клеток к общему количеству клеток. Индекс выражали в процентах (%).

Проточная цитофлуориметрия

Для определения экспрессии специфических поверхностных и внутриклеточных маркеров использовали метод проточной цитофлуориметрии. Иммунофенотипирование методом проточной цитофлуориметрии – это анализ гетерогенной популяции клеток с целью выявления наличия и соотношения популяций интереса путем анализа поверхностных и внутриклеточных антигенов (маркеров), экспрессируемых клетками [Digiuseppe, 2005; Maciorowski, Chattopadhyay, Jain, 2017; Robinson, International Society for Analytical Cytology., 1997]. Анализ и выявление антигенов производили с помощью конъюгированных с флуорохромами антител путем детекции флуоресцентного сигнала проточным цитофлуориметром. В качестве маркеров (антигенов) использовали функциональные протеины мембран, вовлеченные в клеточную коммуникацию, адгезию и метаболизм.

Пермеабиллизацию и фиксацию клеток для последующего окрашивания на внутриклеточные маркеры осуществляли с помощью набора InsideStainKit (Lot 130-090-477, MiltenyiBiotec, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки для окрашивания на поверхностные маркеры ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (MiltenyiBiotec, Германия) в концентрации 100 тыс. клеток в 100 мкл и вносили антитела. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (BeckmanCoulter, США) с помощью программы CXP (BeckmanCoulter, США). В работе были использованы следующие антитела: CD68- PEVio770 (MiltenyiBiotec, Германия), CD86- VioBright FITC (MiltenyiBiotec, Германия), CD11/b-PE (MiltenyiBiotec, Германия), CD163-PE (Thermo Fisher, США), CD45- PerCPVio700 (MiltenyiBiotec, Германия) (Таблица 3).

Таблица 3. Антитела, использованные для проточной цитофлуориметрии.

Антитело	Флуорохром	Клон	Производитель	Концентрация, мкг/100 мкл
К CD68 крысы	PEVio770	REA237	Miltenyi Biotec, Германия	0,075
К CD86 крысы	VioBrightFITC	24F	Miltenyi Biotec, Германия	0,075
К CD11/b крысы	PE	REA325	Miltenyi Biotec, Германия	0,125
К CD11/b крысы	PEVio770	REA325	Miltenyi Biotec, Германия	0,125
К CD163 крысы	PE	ED2	Thermo Fisher, США	0,1
К CD45 крысы	PerCPVio700	REA504	Miltenyi Biotec, Германия	0,1

В качестве изотипических контролей были использованы клетки, меченные следующими антителами: для CD163-PE - Mouse IgG1 kappa Isotype Control, PE (eBioscience™), для CD11b-PE - REA Control S-PE (Miltenyi Biotec), для CD11b-PEVio770 - REA Control S- PEVio770 (Miltenyi Biotec), для CD86 – VioBright FITC - Mouse IgG1-VioBright FITC (Miltenyi Biotec), для CD68-PEVio770 (Miltenyi Biotec) - REA Control (I)-PE-Vio770 (Miltenyi Biotec).

3.8. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Исследование проводили через 24 и 72 часа после активации макрофагов. Суспензию клеток помещали в РНК-лейтер (QIAGEN, Германия), инкубировали в течение суток при +4°C, переносили в низкотемпературный морозильник и хранили при -80°C. Из полученных образцов выделяли тотальную РНК помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия). Синтез кДНК с матрицы полученной тотальной РНК осуществляли готовым набором реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). С полученными кДНК ставили реакцию с помощью готовых наборов реактивов qPCRmix-HS SYBR, содержащих флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I (Евроген, Россия). Праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Выбранные праймеры (Таблица 4) были синтезированы фирмой Евроген (Россия). Для анализа экспрессии генов использовали метод определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии гена по методу M.V. Pfaffl [Pfaffl, 2001] с учетом рекомендаций J. Vandesompele [Vandesompele и др., 2002]. В качестве эндогенного контроля был выбран ген домашнего хозяйства *Gapdh*. Уровень экспрессии гена в активированных макрофагах нормировали на соответствующий показатель в неактивированных M0 клетках. Функциональные группы исследуемых генов представлены в таблице (Таблица 4).

Таблица 4. Список используемых праймеров.

Ген	Праймер	Сиквенс (5' to 3')
<i>IL1β</i>	прямой	CTG TCT GAC CCA TGT GAG CT
	обратный	ACT CCA CTT TGG TCT TGA CTT
<i>IL4</i>	прямой	ATG TAA CGA CAG CCC TCT GA
	обратный	AGC ACG GAG GTA CAT CAC G
<i>IL6</i>	прямой	TAC ATA TGT TCT CAG GGA GAT
	обратный	GGT AGA AAC GGA ACT CCA G
<i>IL10</i>	прямой	GCC CAG AAA TCA AGG AGC AT
	обратный	TGA GTG TCA CGT AGG CTT CTA
<i>IL12a</i>	прямой	CTG CCA AGT GTC TTA ACC AGT
	обратный	GCA GGC CTC CAG TGT GCT
<i>IL13</i>	прямой	CCA GAA GAC TTC CCT GTG CA
	обратный	CCC TCA GTG GCC ATA GCG
<i>IL18</i>	прямой	GAC AAA AGA AAC CCG CCT G
	обратный	ACA TCC TTC CAT CCT TCA CAG
<i>TNFα</i>	прямой	CCA CCA CGC TCT TCT GTC TA
	обратный	GCT ACG GGC TTG TCA CTC G
<i>iNOs</i>	прямой	CGC TGG TTT GAA ACT TCT CAG
	обратный	GGC AAG CCA TGT CTG TGA C
<i>Arg1</i>	прямой	GGA TGA GCA TGA GCT CCA AG
	обратный	GCC AGC TGT TCA TTG GCT T
<i>IL12b</i>	прямой	CTGGTGTCTCCACTCATGG
	обратный	CAGGTGTATTGGCCAGCATC
<i>IL23</i>	прямой	AGAGGGTCTAGTGCAGAGCA
	обратный	ATACGGGGCACGTCACTTTT
<i>MMP2</i>	прямой	CAGACAAAGAGTTGGCAGTG

	обратный	TCAGGTGTGTAACCAATGATC
<i>MMP9</i>	прямой	ATGGTTTCTGCCCCAGTGAG
	обратный	CACCAGCGATAACCATCCGA
<i>CD68</i>	прямой	GACAGTGCCCATCCCCACTT
	обратный	AGAGATTGGTCACTGGCGCA
<i>TIMP1</i>	прямой	CAGACAGCTTTCTGCAACTC
	обратный	CACAGCGTCGAATCCTTTGA
<i>TIMP2</i>	прямой	ATGCAGACGTAAGTGATCAGG
	обратный	AGTCACAGAGGGTAATGTGC
<i>Gapdh</i>	прямой	GCGAGATCCCGCTAACATCA
	обратный	CCCTTCCACGATGCCAAAGT

Таблица 5. Функциональные группы исследуемых генов

Провоспалительные цитокины, обеспечивающие мобилизацию воспалительного ответа: Интерлейкин 1β - IL1β Интерлейкин 6 - IL6 Интерлейкин 12a - IL12a Интерлейкин 12b - IL12b Интерлейкин 18 - IL18 Интерлейкин 23 - IL23 Фактор некроза опухоли α – TNFα	Противовоспалительные цитокины, ограничивающие развитие воспаления: Интерлейкин 10 – IL10 Интерлейкин 4 - IL4 Интерлейкин 13 - IL13 Трансформирующий фактор роста β - TGFβ
Факторы миграции клеток: Матричная металлопротеиназа-2 MMP2 Матричная металлопротеиназа-9 MMP9	Эндогенные (тканевые) ингибиторы металлопротеиназ: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 - TIMP1 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 - TIMP2

Маркеры макрофагов: Индукцируемая NO синтетаза - iNOs Аргиназа - Arg1 CD68	Гены домашнего хозяйства, эндогенный контроль: Gapdh (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
---	--

3.9. Иммуноферментный анализ

Для оценки активности синтеза провоспалительных ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6) и противовоспалительных (IL10) цитокинов применяли полуколичественный анализ содержания белка в образцах с помощью наборов для иммуноферментного анализа ($\text{IL1}\beta$ - SEA563Ra, $\text{TNF}\alpha$ - SEA133Ra, IL6 - SEA079Ra, IL10 - SEA056Ra Cloud-CloneCorp., США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для изучения содержания белков использовалась кондиционированная среда, которая отбиралась на первый и третий день после культивирования и активации макрофагов по описанным выше протоколам.

Нормирование данных проводили по концентрации общего белка, определенной по методу Бредфорда набором Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Измерение оптической плотности ($\lambda=450$ нм) проводили с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США). Анализ данных проводили с помощью онлайн-приложения <http://elisaanalysis.com/app>.

3.10. Изучение фагоцитарной активности макрофагов

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов клетки сажали на чашки для прижизненной микроскопии с толщиной дна 170 мкм и коэффициентом оптического преломления 1,52 (Ibidi, Германия). Далее клетки

активировали в соответствии с протоколом в направлении M1 или M2-фенотипа, затем в среду добавляли латексные частицы диаметром 1,5 мкм (Диа-М) из расчета 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 (фазово-контрастная микроскопия, увеличение x400) через 1, 2, 5 и 24 часа после добавления латексных частиц. С помощью программы Adobe Photoshop CS6 подсчитывали количество фагоцитированных частиц на 1 клетку. Обсчитывали все клетки на каждом из 10 выбранных случайным образом полей зрения.

Изучение поглощения частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green (Thermo Fisher, USA) позволяет оценить зрелость эндосом. Указанный краситель в нейтральной среде не дает флуоресцентного свечения, которое появляется только при снижении pH до 5. Для проведения исследования макрофаги культивировали в 96-луночных планшетах Glass Bottom Viewplate-96, PN 6005430 - black, TC-treated (perkinElmer, Inc), активировали в соответствии с протоколом в направлении M1 или M2-фенотипа, затем в среду добавляли частицы зимозана, конъюгированные с pHrodo™ Green (Thermo Fisher, USA). Интенсивность флуоресценции в каждой лунке измеряли с помощью прибора Cytation 3 MFV (Biotek, USA) и программного обеспечения Software Gen5 3.0 Image Prime (Biotek, USA).

3.11. Трансмиссионная электронная микроскопия

Для трансмиссионной электронной микроскопии культуры макрофагов фиксировали в культуральной среде раствором глutarового альдегида 30 минут в конечной концентрации 2,5%, механическим путем отделяли клетки от субстрата и центрифугировали (400g, 10 мин., 20°C) для получения осадка. Клеточный осадок дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, обезвоживали в этаноле по общепринятой схеме, контрастировали 1% уранилацетатом на 70% этаноле в

процессе обезвоживания и производили заливку в смесь эпон-аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме "LKB-III" (Швеция), срезы 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 толуидинового синего и просматривали на световом микроскопе "Leica DM 2500" с цифровой камерой "Leica DFC 290" (Германия).

3.12. 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 - с помощью t-теста для парных сравнений и теста Хольма-Сидака для множественных сравнений и при распределении, отличного от нормального - с помощью 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).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Разработка оптимальной методики селективного изолирования и получения первичной культуры клеток Купфера из интактной печени и первичной культуры макрофагов костномозгового происхождения

Протокол получения первичной культуры клеток Купфера включает в себя комбинацию следующих методов: *in vivo* перфузия печени буферными растворами с добавлением антикоагулянтов, механическая дезагрегация, ферментативная обработка, градиентное центрифугирование и последующее селективное культивирование.

Для определения экспрессии специфических поверхностных и внутриклеточных маркеров целесообразно использование метода проточной цитофлуориметрии. В дополнение к этому методу применяли метод иммуноцитохимического окрашивания на стеклах. Комбинация этих удобных и точных методов позволяла качественно и количественно определить состав поверхностных и внутриклеточных антигенов клеток в культуре.

Полученные первичные культуры макрофагов, культивированных в ростовой среде без добавления факторов поляризации, считали M0-макрофагами.

4.2. Иммунофенотип первичной культуры клеток Купфера

Чистоту выделенных первичных культур и принадлежность полученных клеток к популяции резидентных тканевых макрофагов оценивали по экспрессии специфического пан-макрофагального маркера млекопитающих CD68 (трансмембранного гликопротеида, входящего в семейство белков лизосомальной мембраны LAMP).

Процент живых клеток в выделенных культурах (n=10), определенный с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США) после окрашивания трипановым синим, составил $97,0 \pm 2,1\%$.

Выделенные в первичные культуры клетки Купфера по своему составу содержали $95,2 \pm 5,1\%$ положительно окрашенных $CD68^+$ клеток, что свидетельствует о высокой чистоте выделенных культур. В популяции нативных клеток Купфера практически отсутствовали $CD11b^+$ макрофаги, их количество составляло $5,8 \pm 1,7\%$ от всех выделенных из интактной печени культур. Доля $CD163^+$ макрофагов (маркер M2 макрофагов) среди клеток, выделенных в первичную культуру, составляет $70,2 \pm 9,8\%$, $CD86^+$ клеток (маркер M1 макрофагов) в этих же культурах - $26,2 \pm 4,1\%$ (Рисунок 6).

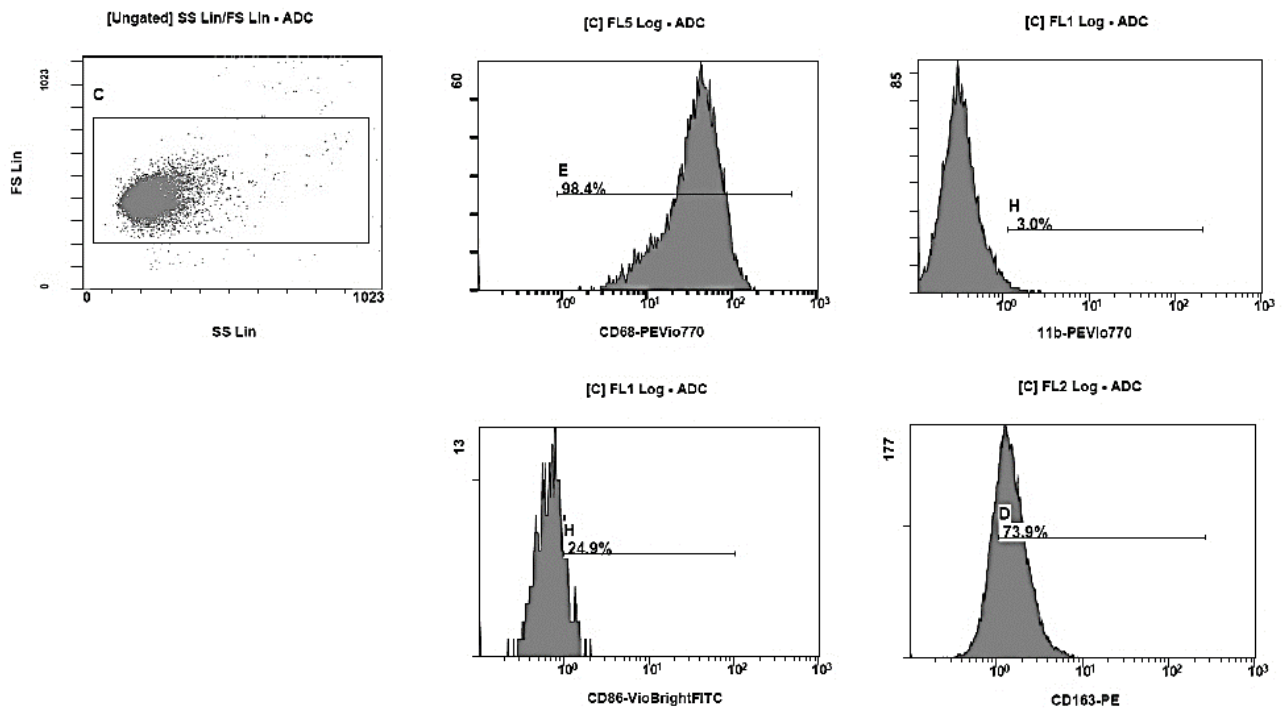


Рисунок 6. Определение стратегии гейтирования по параметрам прямого *FS* и бокового *SS* светорассеяния, оценка чистоты и иммунофенотип первичной культуры (M0) клеток Купфера на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров $CD68$, $CD11b$, $CD86$, $CD163$.

Таким образом, фенотип клеток Купфера, выделенных в первичную культуру вышеописанным методом, был $CD68^+CD163^+CD11b^-CD86^+$.

При изучении фенотипа этих клеток методом иммуноцитохимии было установлено, что $86,1 \pm 5,1\%$ клеток экспрессируют маркер CD68, $91,5 \pm 6,1\%$ клеток имеют на своей поверхности маннозный рецептор типа C - CD206 (маркер M2 макрофагов). Индуцированная синтаза оксида азота (NO- синтаза, iNos), фермент группы NO-синтаз млекопитающих (маркер M1 макрофагов), экспрессировался у $69,2 \pm 5,9\%$ клеток, фермент аргиназа Arg1 (маркер M2 макрофагов), присутствовал на $80,2 \pm 6,0\%$ макрофагах в первичной культуре (Рисунок 7).

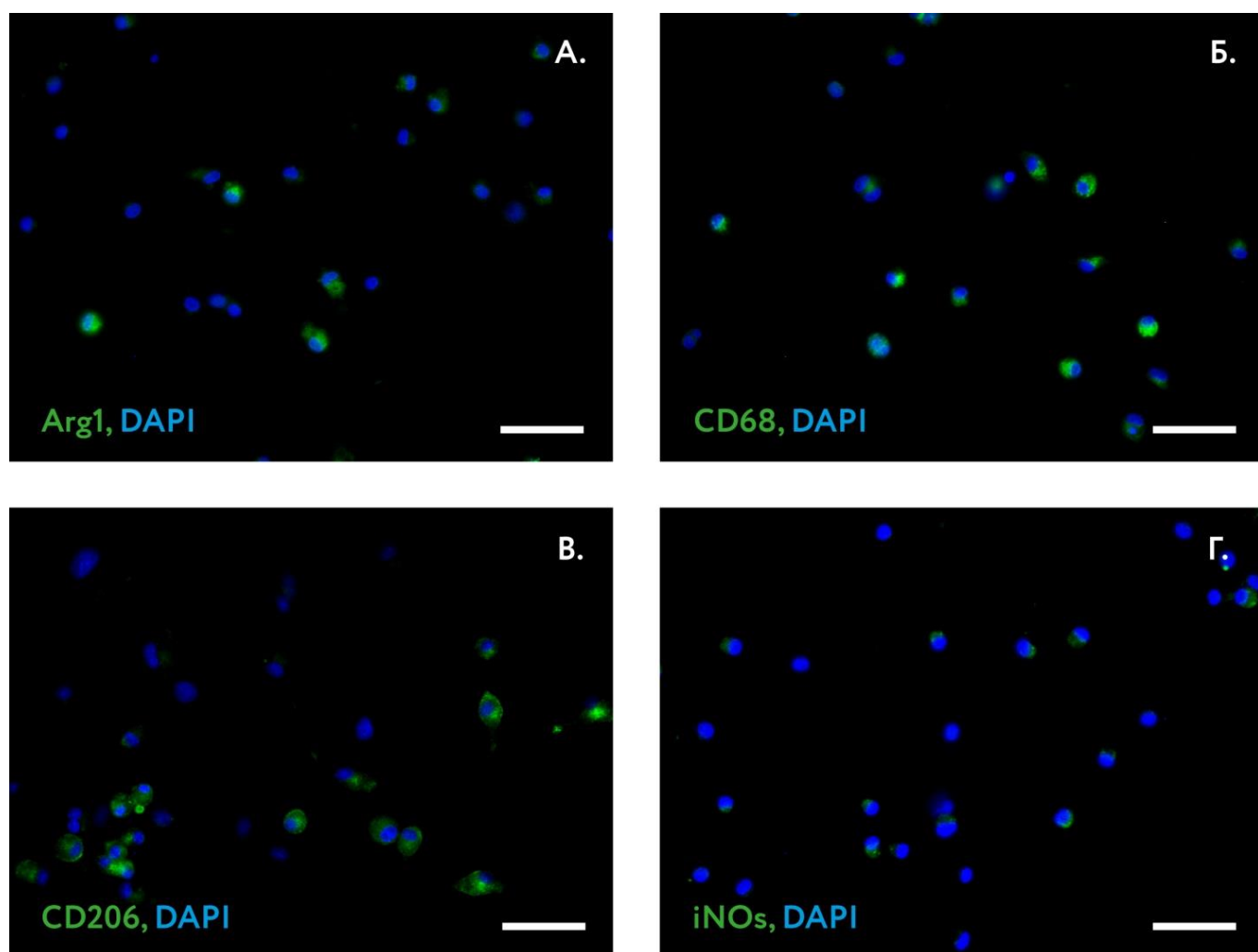


Рисунок 7. Фенотип первичной культуры M0 макрофагов эмбрионального происхождения (клетки Купфера). Экспрессия маркеров CD68, CD206, iNOs, Arg1. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

4.3. Иммунофенотип первичной культуры костномозговых макрофагов

Способ селективного изолирования и получения первичной культуры макрофагов костномозгового происхождения из моноцитов крови крысы основан на градиентном центрифугировании цельной крови на препарате синтетического высокомолекулярного сополимера полисахарозы (коммерческое название Фиколл) и последующем селективном культивировании.

Чистоту выделения первичных культур макрофагов ($n=11$), производных моноцитов крови и принадлежность полученных культур клеток к популяции макрофагов костномозгового происхождения крови крысы оценивали по экспрессии специфического поверхностного маркера CD11b и пан-макрофагального маркера CD68. Процент живых клеток, определенный с помощью анализатора TC20 (Bio-Rad, США) после окрашивания трипановым синим составил $96,9 \pm 2,1\%$.

Выделенные в первичные культуры макрофаги были CD11b положительными: $90,9 \pm 2,9\%$ клеток экспрессировали маркер CD11b, что подтверждает принадлежность изолированных клеток к популяции макрофагов костномозгового происхождения.

Полученные первичные культуры неактивированных макрофагов костномозгового происхождения по своему составу содержали $94,0 \pm 2,7\%$ положительно окрашенных по маркеру CD68⁺ клеток. Это также свидетельствует о высокой чистоте выделенных культур. Клеток, несущих маркер CD163 (маркер M2 макрофагов), было $92,2 \pm 6,1\%$. Процент клеток, экспрессирующих маркер CD86 (маркер M1 макрофагов), также был достаточно высоким - $92,0 \pm 6,2\%$ (Рисунок 8).

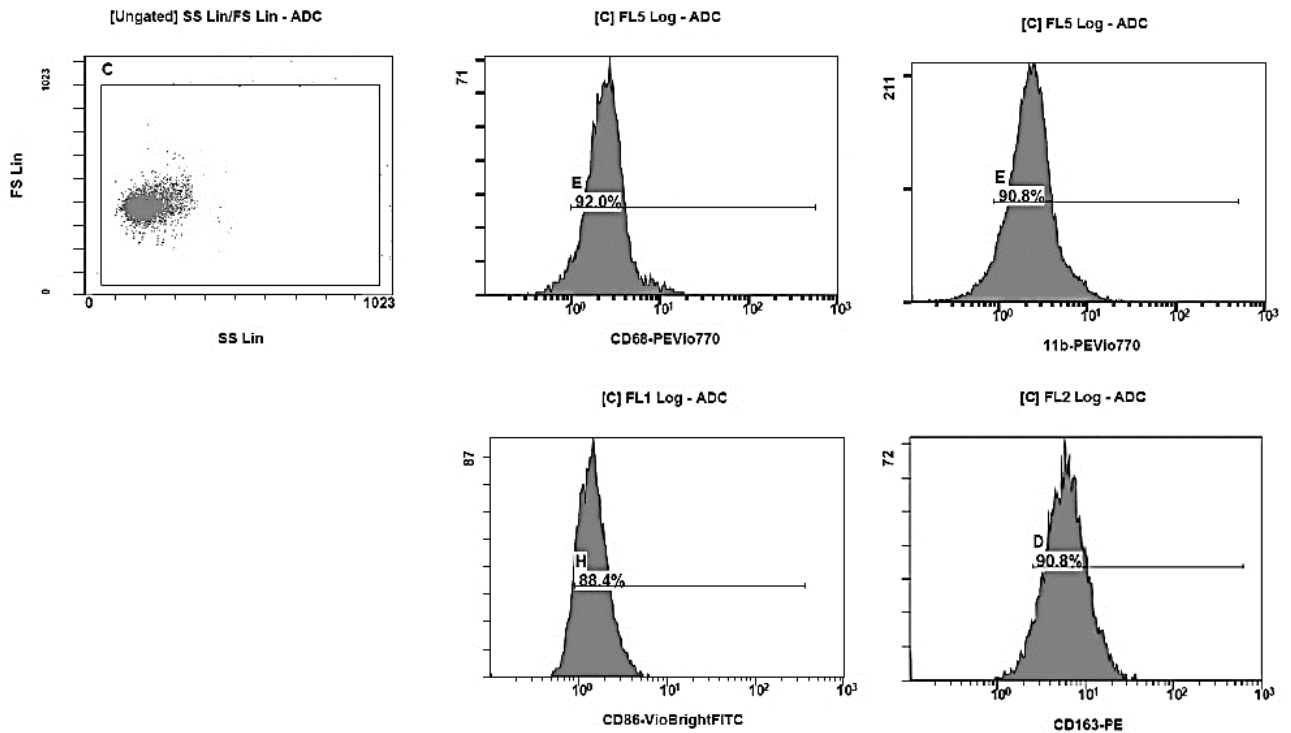


Рисунок 8. Определение стратегии гейтирования по параметрам прямого *FS* и бокового *SS* светорассеяния, оценка чистоты и иммунофенотип первичной культуры (M0) макрофагов костномозгового происхождения на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163.

Таким образом, фенотип интактных макрофагов костномозгового происхождения, полученных из крови крысы методом с использованием градиентного центрифугирования, был $CD68^+CD163^+CD11b^+CD86^+$.

Оценка фенотипа методом иммуноцитохимии неактивированных макрофагов костномозгового происхождения показала, что $92,3 \pm 4,2\%$ клеток экспрессируют маркер CD68, $80,6 \pm 5,2\%$ клеток - CD206 (маркер M2 макрофагов). Индуцированная синтаза оксида азота iNOs (маркер M1 макрофагов) присутствует у $86,0 \pm 5,1\%$ клеток. Экспрессия фермента аргиназы Arg1 (маркер M2 макрофагов) выражена у $72,3 \pm 4,9\%$ клеток, выделенных в первичную культуру (Рисунок 9).

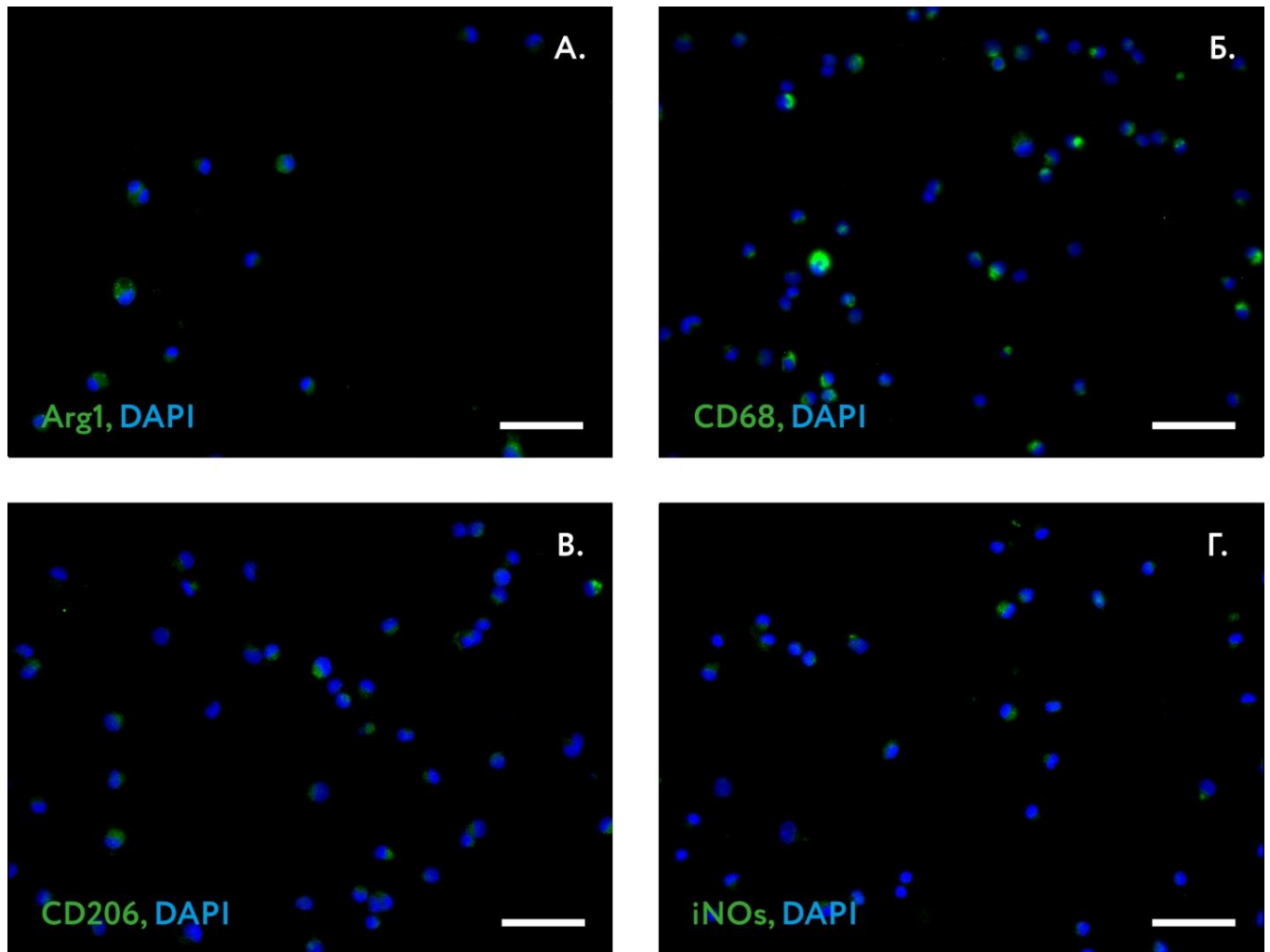


Рисунок 9. Фенотип первичной M0 культуры макрофагов костномозгового происхождения. Экспрессия маркеров CD68, CD206, iNOs, Arg1. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

4.4. Сравнение иммунофенотипов неактивированных (M0) клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

При сравнении иммунофенотипов неактивированных (M0) макрофагов костномозгового происхождения ($CD68^+CD11b^+CD163^+CD86^+$) с фенотипом M0

клеток Купфера ($CD68^+CD11b^-CD163^+CD86^+$) были выявлены следующие различия. Костномозговые макрофаги содержали $90,9 \pm 2,9\%$ клеток положительных по маркеру CD11b, в то время как, $CD11b^+$ макрофаги среди клеток Купфера практически отсутствовали ($5,8 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$)). Доля клеток, экспрессирующих маркер CD86 (маркер M1 макрофагов) была высокой $92,0 \pm 6,2\%$, в культуре костномозговых макрофагов по сравнению с экспрессией его в клетках Купфера ($26,2 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$)). Клеток, несущих маркер CD163 (маркер M2 макрофагов) в костномозговых макрофагах $92,2 \pm 6,1\%$ также было достоверно больше, чем в клетках Купфера ($70,2 \pm 9,8\%$ ($p < 0,05$)). По экспрессии маркера CD68 достоверных различий не было.

По данным иммуноцитохимического окрашивания, при подсчете положительно окрашенных клеток статистически значимых различий в экспрессии CD68 и аргиназы Arg1 отмечено не было. Экспрессия по маркеру M2 макрофагов CD206 в культуре клеток Купфера была достоверно выше ($91,5 \pm 6,1\%$) чем в костномозговых макрофагах ($80,6 \pm 5,2\%$ ($p < 0,05$)). Количество клеток, несущих iNOs (маркер M1 макрофагов), было статистически значимо больше в культурах костномозговых макрофагов ($86,0 \pm 5,1\%$) по сравнению с клетками Купфера ($69,2 \pm 6,1\%$, $p < 0,05$) (Рисунок 10).

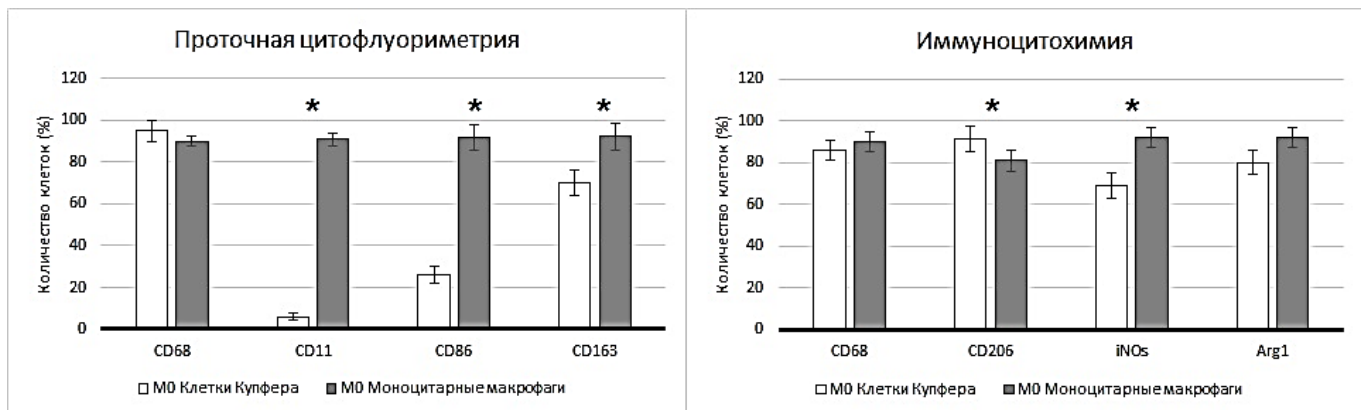


Рисунок 10. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163, CD206, iNOs, Arg1 в клетках Купфера и макрофагах костномозгового (моноцитарного) происхождения без воздействия факторов активации (M0). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Нами была разработана оптимальная методика селективного изолирования и получения первичной культуры макрофагов эмбрионального происхождения (клетки Купфера) из интактной печени крысы и макрофагов костномозгового (моноцитарного) происхождения из периферической крови.

Таким образом, предложенный оптимальный протокол селективного изолирования и получения первичных культур макрофагов из интактной печени и из моноцитов крови крысы позволил получить стабильные жизнеспособные культуры с воспроизводимым иммунофенотипом, который достоверно позволяет отнести их к изучаемым типам клеток: макрофагам эмбрионального происхождения (высокая экспрессия пан-макрофагального маркера CD68 и отсутствие экспрессии CD11b) и макрофагам костномозгового происхождения (высокая экспрессия пан-макрофагального маркера CD68 и поверхностного маркера CD11b). При сравнении экспрессии маркеров M1 и M2 макрофагов в полученных культурах нативных (M0) клеток Купфера и костномозговых макрофагов было выявлено, что макрофаги – производные моноцитов крови более выраженно экспрессируют маркеры M1-активации (CD86 и iNOs). Эти

клетки также экспрессируют маркер M2-активации CD163. Нативные клетки Купфера более выраженно экспрессировали маркер M2-активации CD206.

4.5. Сравнительная характеристика иммунофенотипа неактивированных (M0) и поляризованных по M1 и M2-фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения по маркерам CD11b, CD68, CD163, CD86, CD206, Arg1, iNOs.

Согласно M1/M2 парадигме поляризации макрофагов, выделяют два типа их активации: классический, или провоспалительный путь активации (M1-фенотип), и альтернативный 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.

Полученные вышеописанными методами стабильные и жизнеспособные M0 культуры клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения с изученным иммунофенотипом подвергали *in vitro* активации с помощью коктейлей факторов в направлении классического провоспалительного M1-фенотипа (M1-макрофаги) и альтернативного противовоспалительного M2-фенотипа (M2-макрофаги).

Прокол активации по M1 классическому фенотипу был одинаков как для макрофагов эмбрионального происхождения, так и для клеток костномозгового происхождения, конечная концентрация LPS и IFN- γ в ростовой среде составляла 40 нг/мл. Активирующая среда, индуцирующая альтернативный провоспалительный M2 фенотип, также была одинакова для клеточных популяций разного происхождения и содержала коктейль интерлейкинов IL4, IL10 и IL13 в концентрации 20 нг/мл. Данная схема активации нативных первичных культур макрофагов разного происхождения позволила получить популяции клеток, активированных по разным фенотипам, уже через 24 часа

после добавления индуцирующих поляризацию факторов. В результате добавления в М0 первичные культуры макрофагов индуцирующих факторов были получены следующие культуры:

макрофаги эмбрионального происхождения - резидентные макрофаги печени крысы (клетки Купфера), поляризованные по классическому – провоспалительному пути (М1-фенотипу) (n=10);

макрофаги эмбрионального происхождения - резидентные макрофаги печени крысы (клетки Купфера), поляризованные по альтернативному – противовоспалительному пути (М2-фенотипу) (n=10);

макрофаги костномозгового происхождения – производные моноцитов, выделенные из крови крысы, поляризованные по классическому – провоспалительному пути (М1-фенотипу) (n=11);

макрофаги костномозгового происхождения – производные моноцитов, выделенные из крови крысы, поляризованные по альтернативному – противовоспалительному пути (М2-фенотипу) (n=11).

Добавление индуцирующих сред для М1 и М2 активации не влияло на жизнеспособность клеток в культуре. Количество живых клеток во всех четырех группах, после окрашивания трипановым синим, составило для клеток Купфера, активированных по направлению М1 - $97,6 \pm 2,2\%$, по пути М2 - $97,0 \pm 2,1\%$; для костномозговых макрофагов, активированных по направлению М1 - $96,1 \pm 2,1\%$, по М2 - $97,7 \pm 1,7\%$.

Клетки, культивированные в среде с добавлением факторов поляризации по классическому – провоспалительному пути (М1-фенотипу), считали М1-макрофагами, по альтернативному – противовоспалительному пути (М2-фенотипу) – М2-макрофагами.

Таким образом, активация факторами М1 или М2 среды приводила к изменению фенотипа как клеток Купфера, так и макрофагов костномозгового происхождения.

4.6. M1 активация клеток Купфера

Под действием M1 индуцирующих факторов количество клеток положительных по маркеру CD68 в культурах клеток Купфера составило $94,0 \pm 3,6\%$, маркер CD11b - $3,9 \pm 1,2\%$, маркер CD163 - $53,8 \pm 5,8 \%$. Количество клеток, экспрессирующих маркер CD86, составило $26,8 \pm 5,9 \%$ (Рисунок 11).

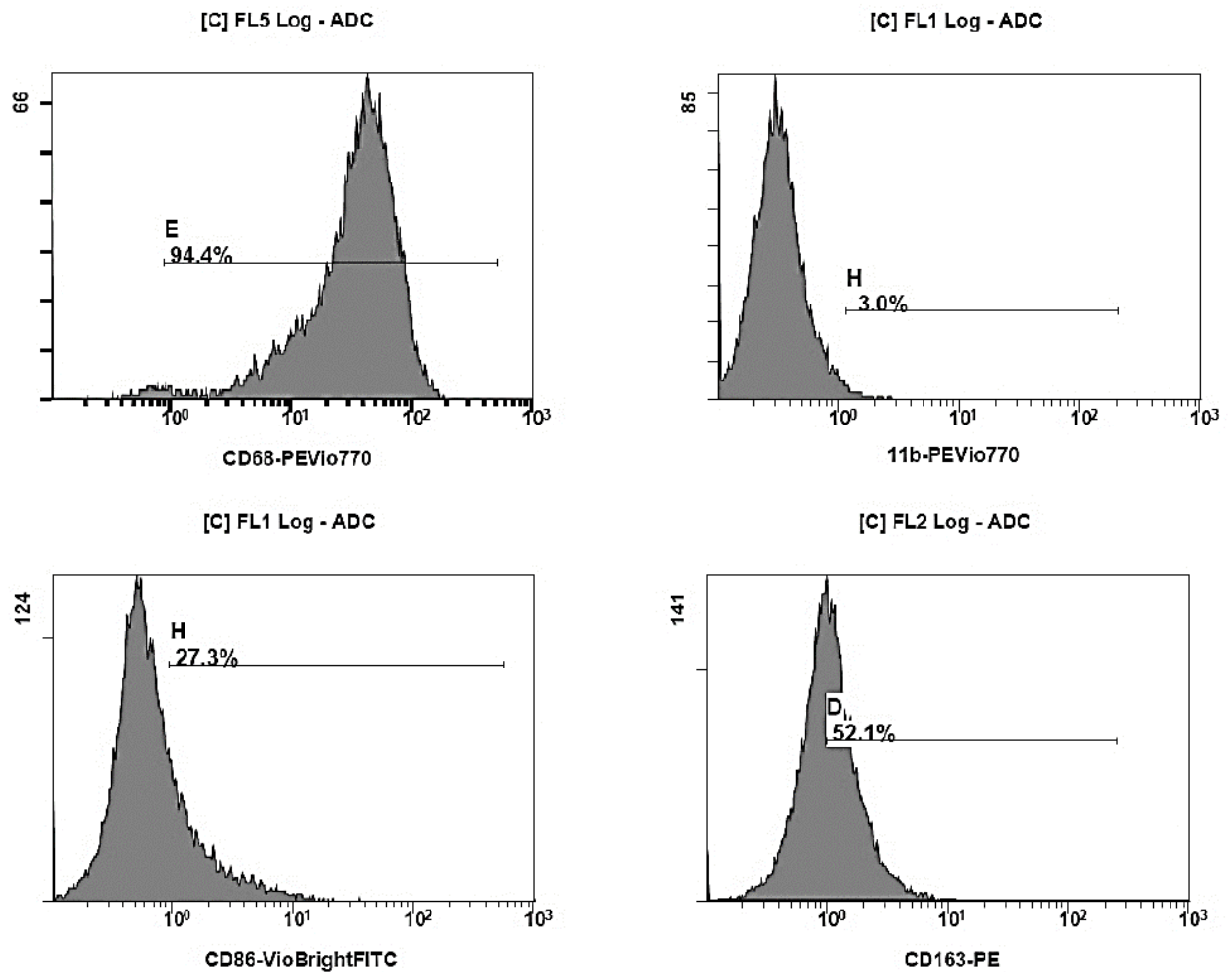


Рисунок 11. Иммунофенотип клеток Купфера, активированных по M1-фенотипу, на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163.

Иммуноцитохимическое исследование выявило, что при активации по M1 пути CD206 в клетках Купфера экспрессировался на высоком уровне: $90,1 \pm 5,2\%$ клеток, экспрессия маркера iNOs составила $90,3 \pm 5,0\%$, а маркера Arg1 - $21,6 \pm 5,1\%$ (Рисунок 12).

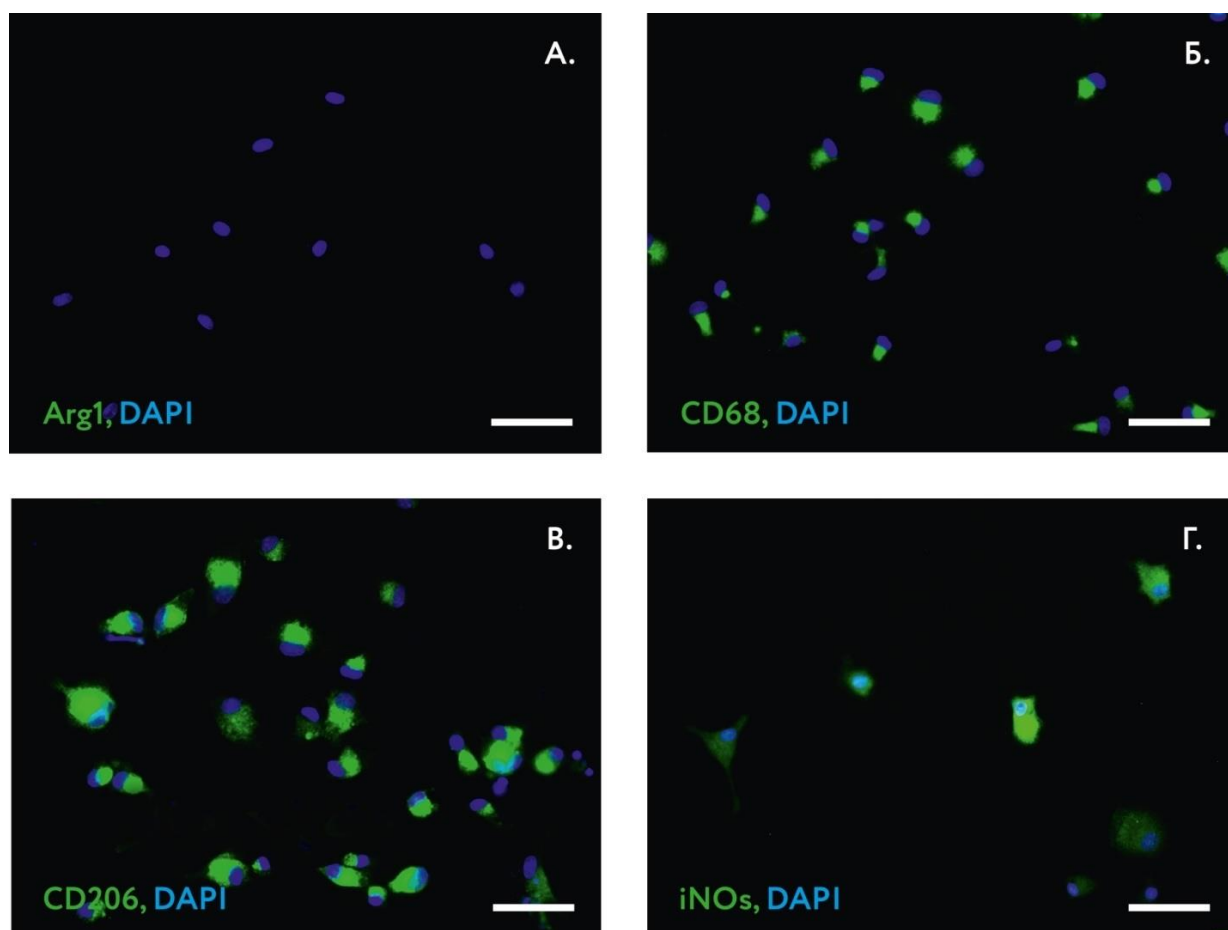


Рисунок 12. Фенотип клеток Купфера, активированных по M1-фенотипу. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

Количество клеток, положительных по маркерам CD68, CD11b, CD206, CD86 в культурах клеток Купфера под действием M1 факторов достоверно не отличается от экспрессии этих маркеров без воздействия факторов активации.

Воздействие факторов поляризации M1 значимо влияло на экспрессию CD163 (маркер M2 макрофагов), которая достоверно снижалась в сравнении с M0 ($p<0,05$). При активации клеток Купфера по M1 пути процент клеток, экспрессирующих iNOs (маркер M1 макрофагов), был достоверно выше, чем в популяции M0 ($p<0,05$). Поляризация по пути M1 привела к значительному достоверному снижению экспрессии Arg1 (маркер M2 макрофагов) по сравнению с M0 ($p<0,05$) (Рисунок 13).

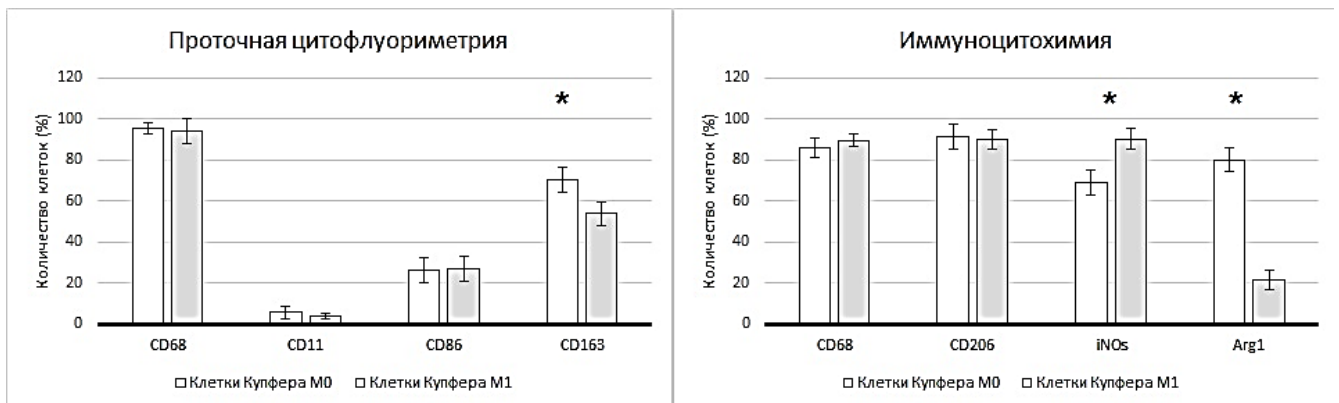


Рисунок 13. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163, CD206, iNOs, Arg1 в клетках Купфера без воздействия факторов активации (M0) и активированных по M1-фенотипу (M1). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

4.7. M1 активация макрофагов костномозгового происхождения

Под влиянием среды, индуцирующей поляризацию по пути M1, количество клеток, положительных по маркеру CD68, в костномозговых макрофагах составило $91,8 \pm 3,7\%$, по маркеру CD11b достигло $93,0 \pm 4,2\%$, CD163 - $57,7 \pm 3,9\%$, CD86 - $30,6 \pm 2,6\%$ клеток (Рисунок 14).

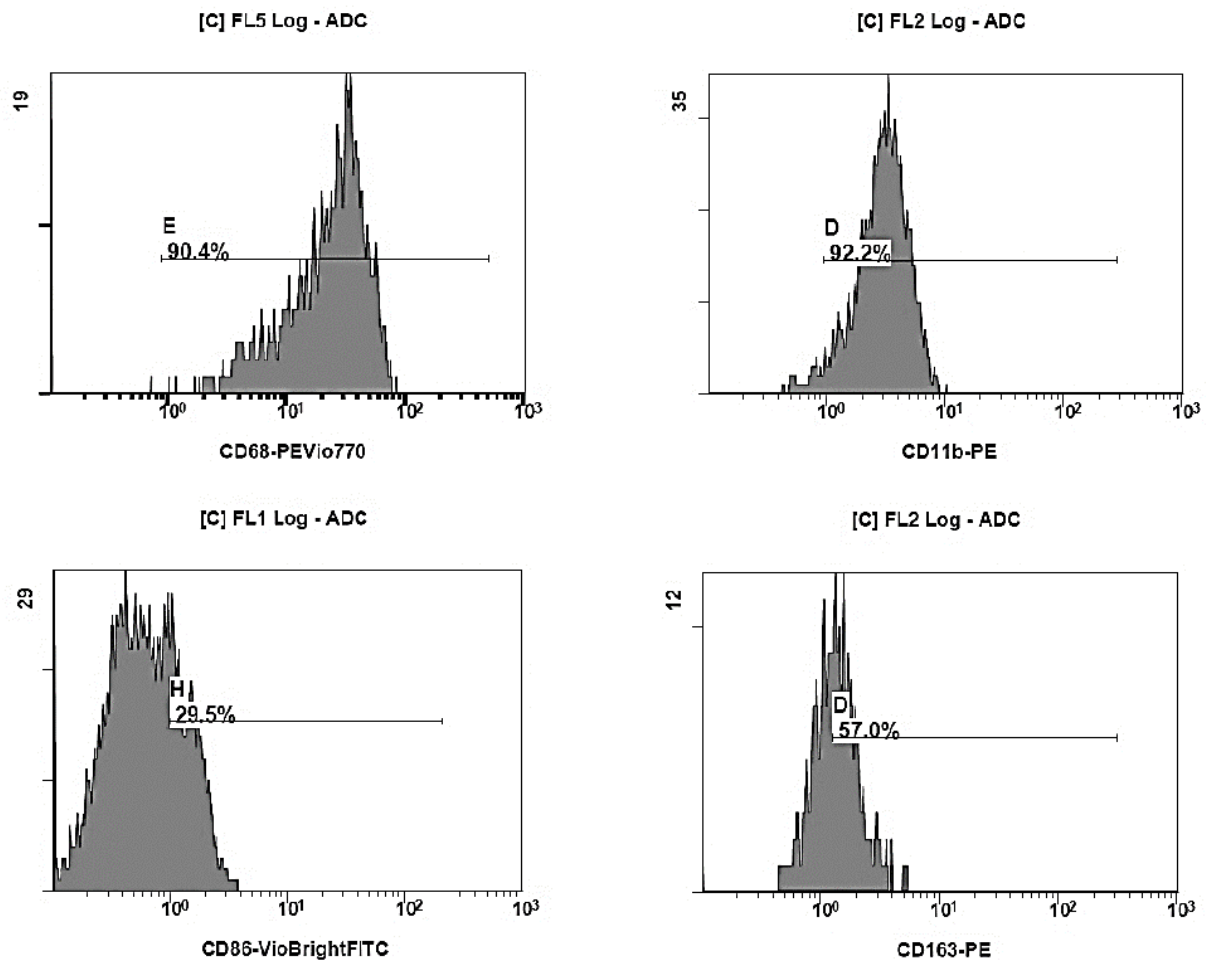


Рисунок 14. Иммунофенотип макрофагов костномозгового происхождения, активированных по M1-фенотипу, на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163.

По данным иммуноцитохимического окрашивания на стеклах, в культурах костномозговых макрофагов количество клеток, положительных по маркеру CD206, составило $92,5 \pm 4,2\%$, Экспрессия индуцируемой NO-синтазы была выявлена в $87,5 \pm 4,1\%$ клеток, экспрессия Arg1 – $16,6 \pm 3,9\%$. Количество клеток, положительных по маркеру CD68, достигло $93,4 \pm 3,0\%$ (Рисунок 15).

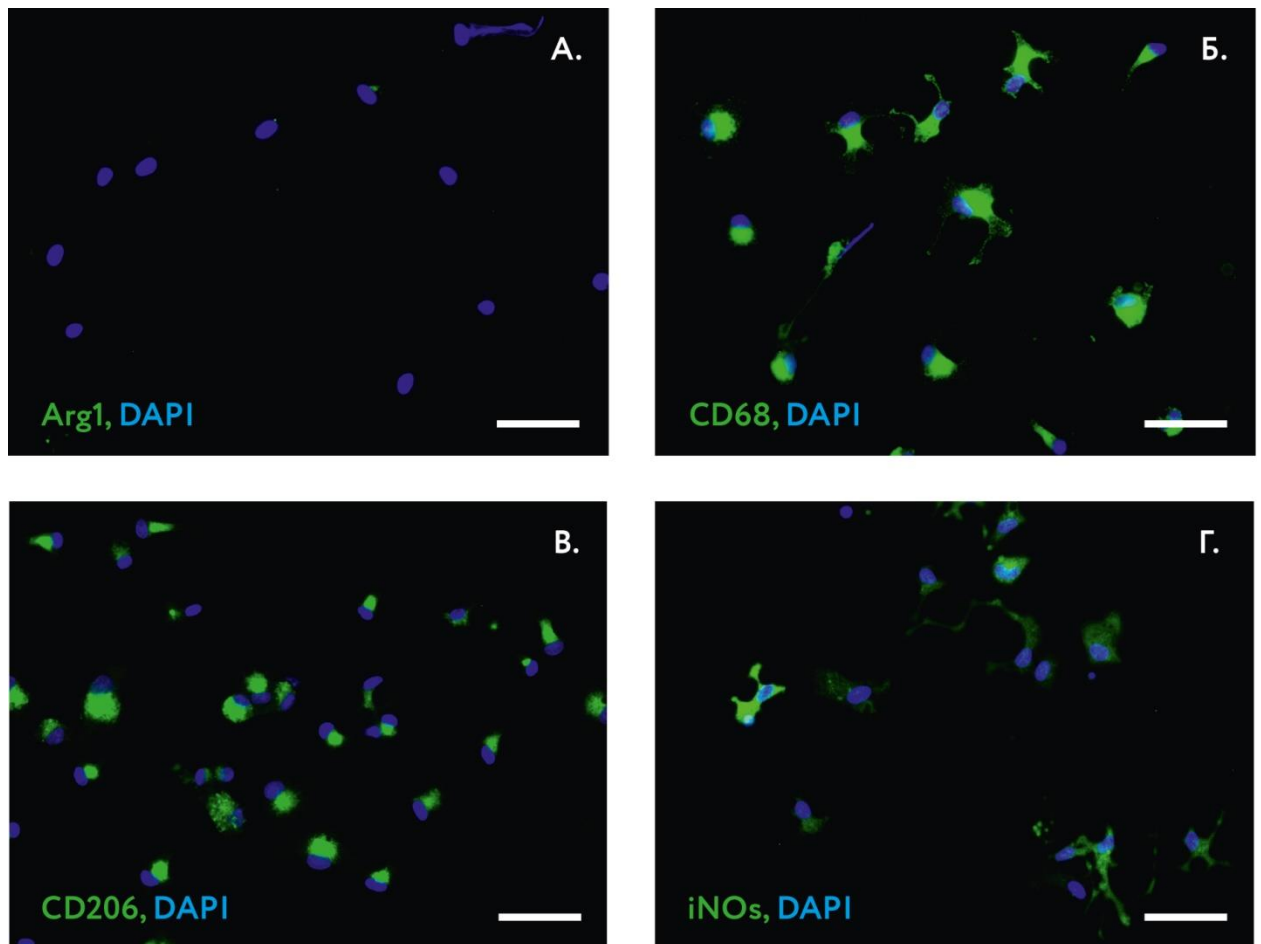


Рисунок 15. Фенотип макрофагов костномозгового происхождения, активированных по М1-фенотипу. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

Количество клеток, положительных по маркерам CD68 CD11b, CD206 в костномозговых макрофагах достоверно не отличалось в М0 культурах и в условиях М1 поляризации. Воздействие факторов М1 поляризации влияло на экспрессию CD163 (маркер М2 макрофагов): по сравнению с неактивированными М0 клетками, количество макрофагов, экспрессирующих маркер CD163, снизилось ($p < 0,05$). Экспрессия CD86 (маркер М1 макрофагов) достоверно

уменьшилась по сравнению с макрофагами M0 ($p<0,05$). Процент клеток, экспрессирующих iNOs (маркер M1 макрофагов) после M1 активации, статистически значимо не отличался от M0. Поляризация по M1 фенотипу привела к достоверному снижению клеток, экспрессирующих Arg1 (Рисунок 16).

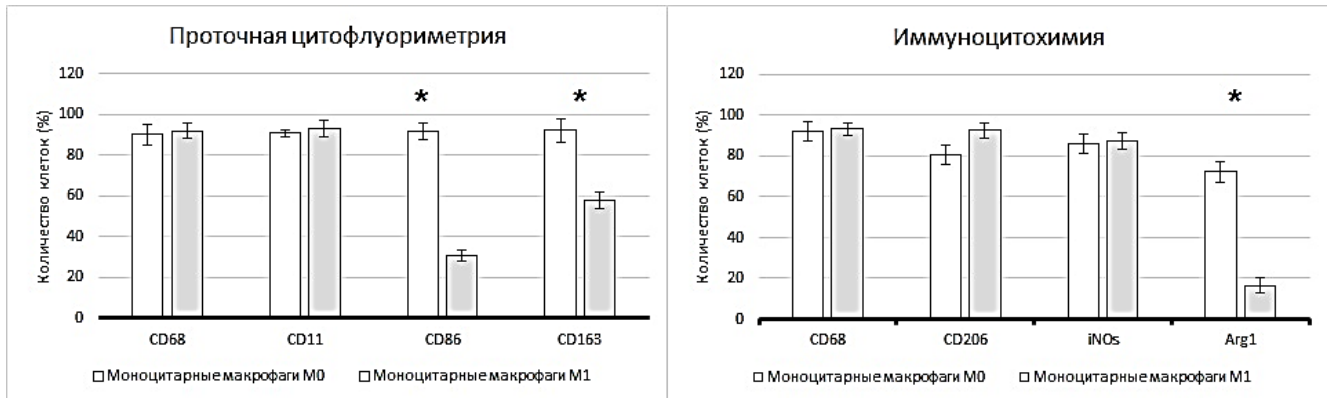


Рисунок 16. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD206, CD163, iNOs, Arg1 в костномозговых (моноцитарных) макрофагах без воздействия факторов активации (M0) и активированных по M1-фенотипу (M1). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

При сравнении активированных макрофагов различного происхождения количество клеток, положительных по маркерам CD68, CD86, CD206, iNOs, Arg1 статистически значимо не различалось в группах макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера. Клеток, экспрессирующих CD11b, было достоверно больше в культурах костномозговых макрофагов ($93,0 \pm 4,2\%$) по сравнению с культурами клеток Купфера ($3,9 \pm 1,2\%$ ($p<0,05$)). Экспрессия маркера CD163 была статистически значимо ниже в группе клеток Купфера ($53,8 \pm 5,8\%$) в сравнении с костномозговыми макрофагами ($57,7 \pm 3,9\%$ ($p<0,05$)) (Рисунок 17).

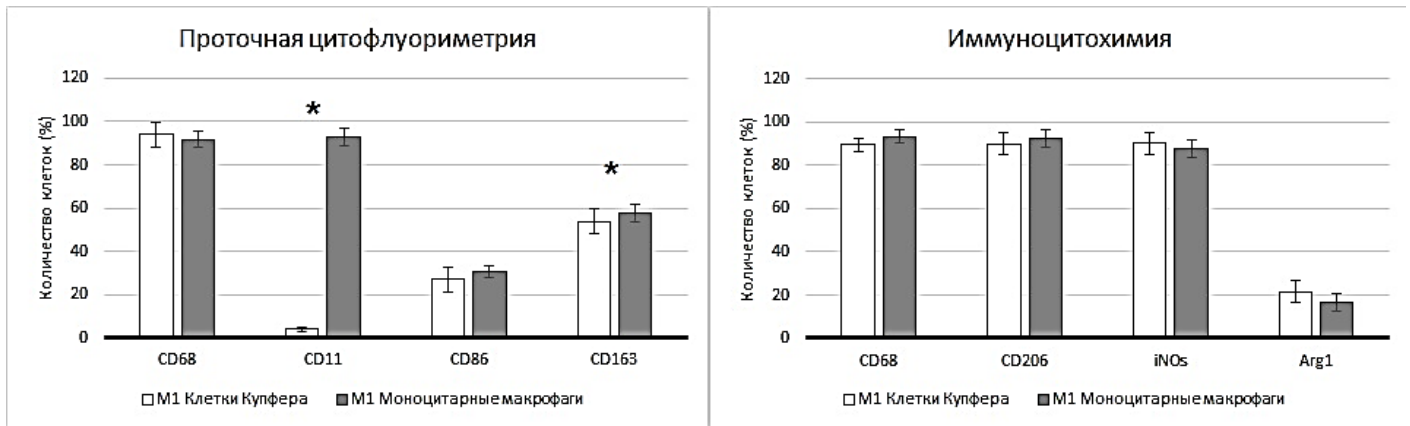


Рисунок 17. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163, CD206, iNOs, Arg1 в клетках Купфера и макрофагах костномозгового (моноцитарного) происхождения, активированных по M1-фенотипу (M1). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

4.8. M2 активация клеток Купфера

Под действием M2 индуцирующих факторов количество клеток, положительных по маркеру CD68 в культурах клеток Купфера, составило $95,9 \pm 6,2\%$. Количество клеток, несущих маркер CD11b среди M2 активированных клеток Купфера, стало $5,7 \pm 1,7\%$, CD163 - $60,4 \pm 5,0\%$, CD86 - $20,7 \pm 3,6\%$ (Рисунок 18).

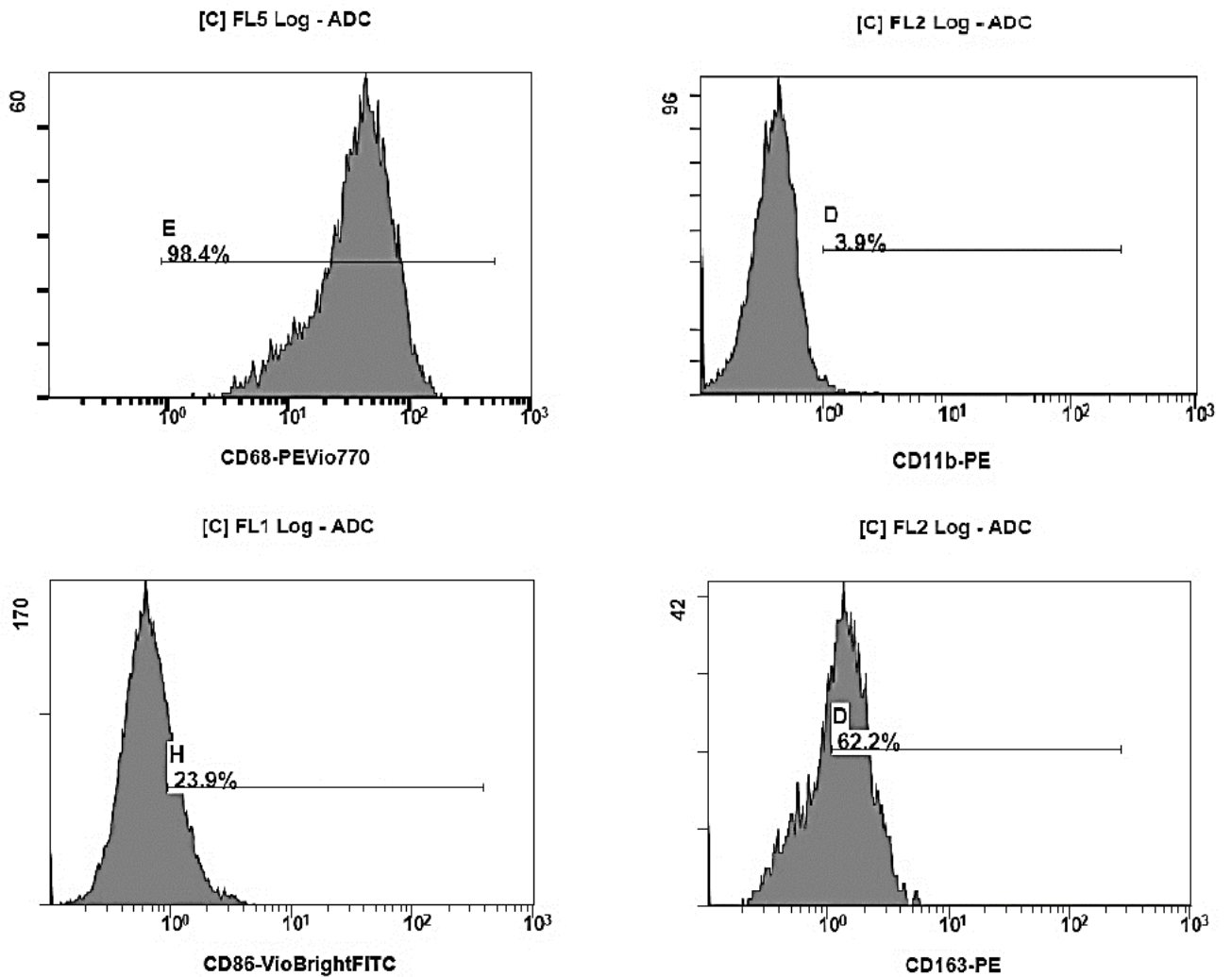


Рисунок 18. Иммунофенотип клеток Купфера, активированных по M2-фенотипу, на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163.

При активации по M2 пути рецептор CD206 в клетках Купфера экспрессировался на высоком уровне $92,5 \pm 5,2\%$. Процент клеток, экспрессирующих iNOs, составил $10,1 \pm 5,1\%$, Arg1 - $94,6 \pm 4,9\%$, CD68 - $89,2 \pm 3,5\%$ (Рисунок 19).

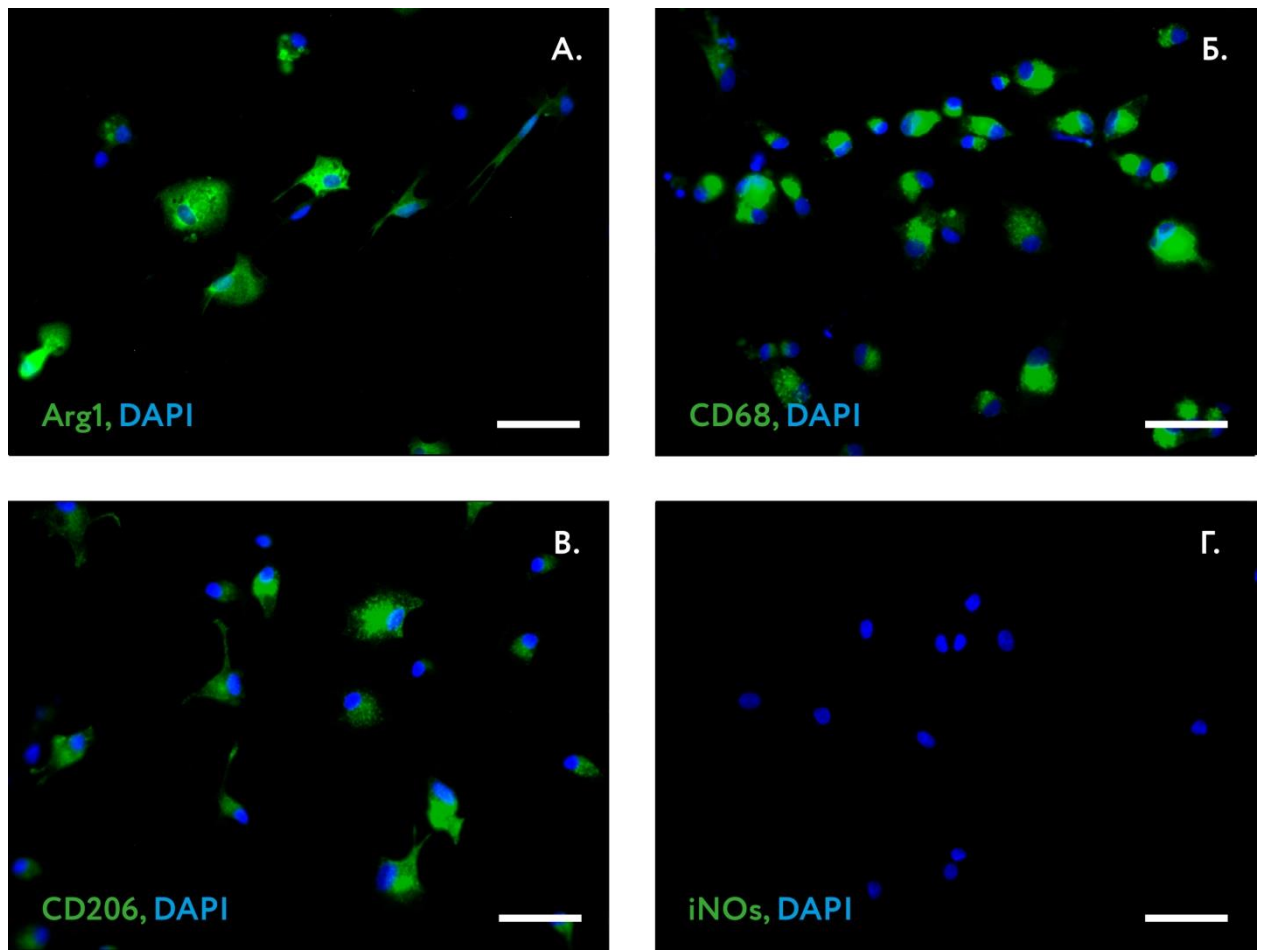


Рисунок 19. Фенотип клеток Купфера, активированных по M2-фенотипу. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

Количество клеток, положительных по маркерам CD68, CD11b, CD86, CD206 и Arg1, в культурах клеток Купфера под влиянием M2 индуцирующих факторов достоверно не отличалось от экспрессии этих маркеров в культурах без воздействия факторов активации. Экспрессия CD163 (маркер M2 макрофагов) положительных клеток достоверно снизилась, так же, как и доля клеток, экспрессирующих iNOs (маркер M1 макрофагов) (Рисунок 20).

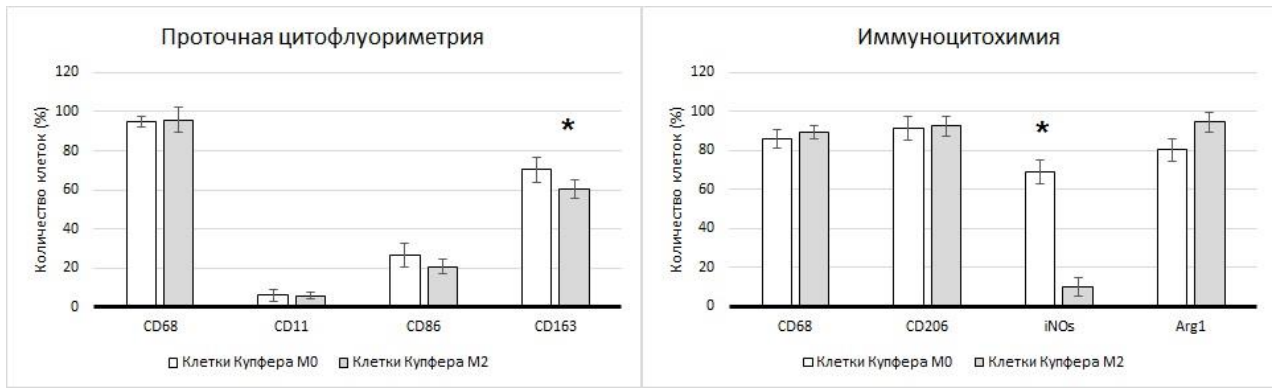


Рисунок 20. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD206, CD163, iNOs, Arg1 в клетках Купфера без воздействия факторов активации (M0) и активированных по M2-фенотипу (M2). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

4.9. M2 активация макрофагов костномозгового происхождения

Под влиянием индуцирующей среды M2 в костномозговых макрофагах количество клеток, положительных по маркеру CD68, составило $92,5 \pm 5,7\%$. Количество клеток, несущих маркер CD11b, сохранялось высоким: $91,5 \pm 3,9\%$. Количество клеток, положительных по маркеру CD163, составило $68,9 \pm 4,8\%$, по маркеру CD86 - $72,2 \pm 7,2\%$ (Рисунок 21).

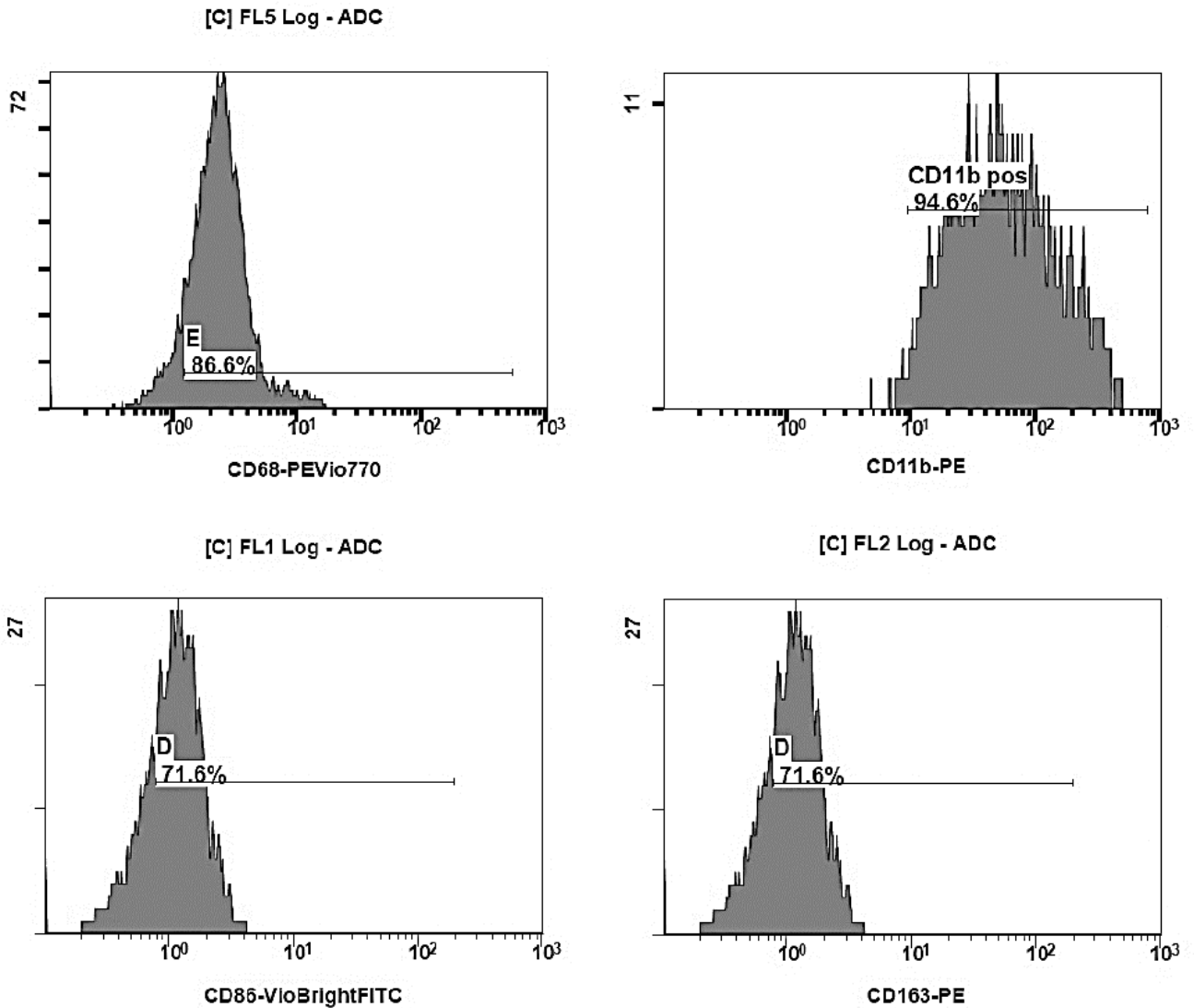


Рисунок 21. Иммунофенотип макрофагов костномозгового происхождения, активированных по M2-фенотипу, на примере единичной культуры. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163.

В культурах костномозговых макрофагов, активированных по M2 пути, рецептор CD206 по-прежнему экспрессировался на высоком уровне: $90,4 \pm 4,1\%$. Процент клеток, экспрессирующих iNOs, составил $35,4 \pm 4,0$ Arg1 - $92 \pm 3,9\%$. Количество клеток, положительных по маркеру CD68, оцененное методом иммуногистохимии на стеклах, достигло $94 \pm 3,1\%$ (Рисунок 22).

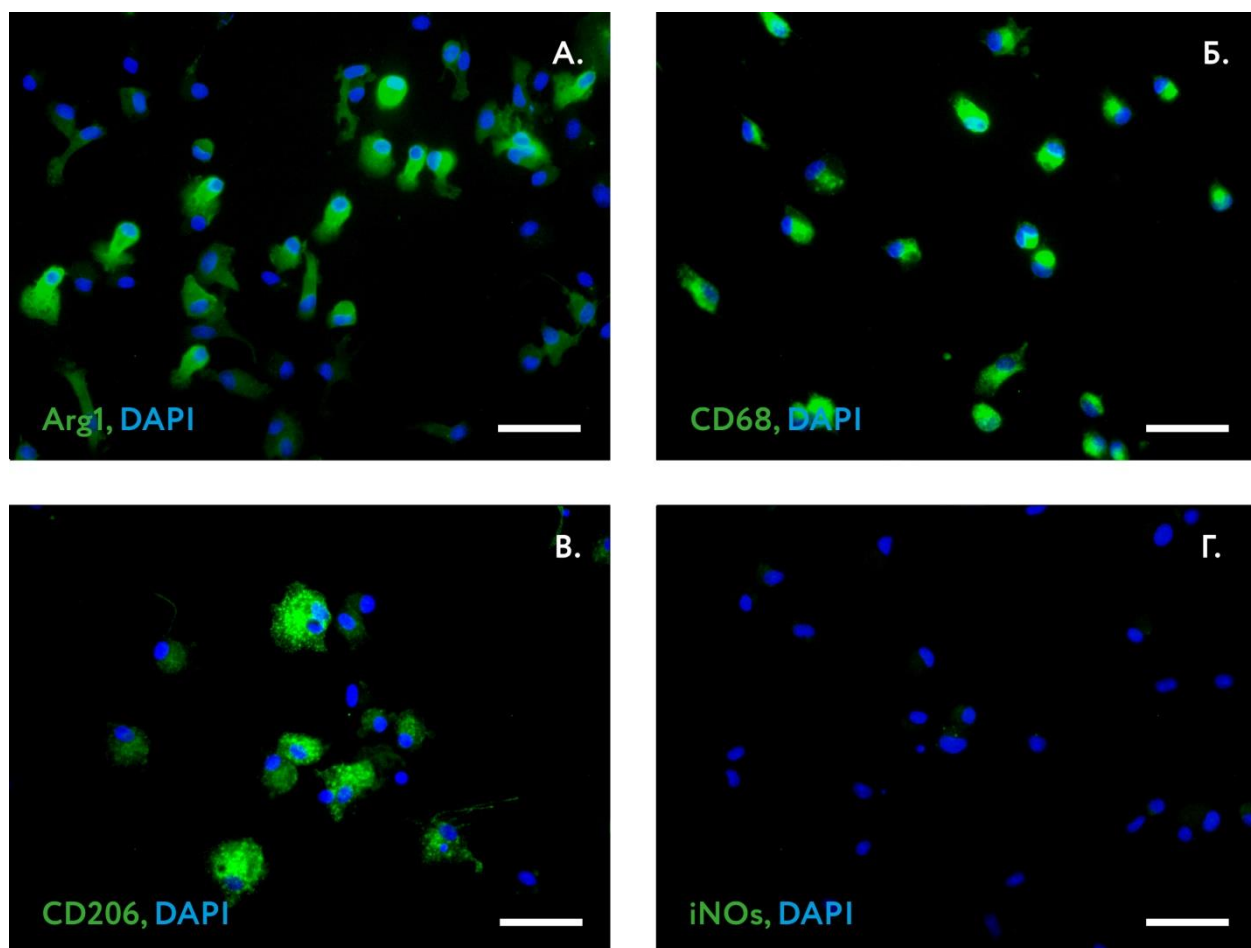


Рисунок 22. Фенотип культуры макрофагов костномозгового происхождения, активированных по M2-фенотипу. Флуоресцентная микроскопия: маркеры CD68, CD206, iNOs, Arg1 визуализировали с помощью вторых антител, конъюгированных с FITC - зеленое свечение, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм. А - экспрессия маркера Arg1; Б - экспрессия маркера CD68; В - экспрессия маркера CD206; Г - экспрессия маркера iNOs.

Количество клеток, положительных по маркерам CD68, CD11b, CD206, CD86 и Arg1, в культурах костномозговых макрофагов без воздействия факторов активации достоверно не отличался от экспрессии этих маркеров под действием M2 индуцирующих факторов. Экспрессия CD163 (маркер M2 макрофагов) достоверно снизилась. При активации клеток по M2 пути процент клеток, экспрессирующих iNOs (маркер M1 макрофагов), достоверно уменьшился (Рисунок 23).

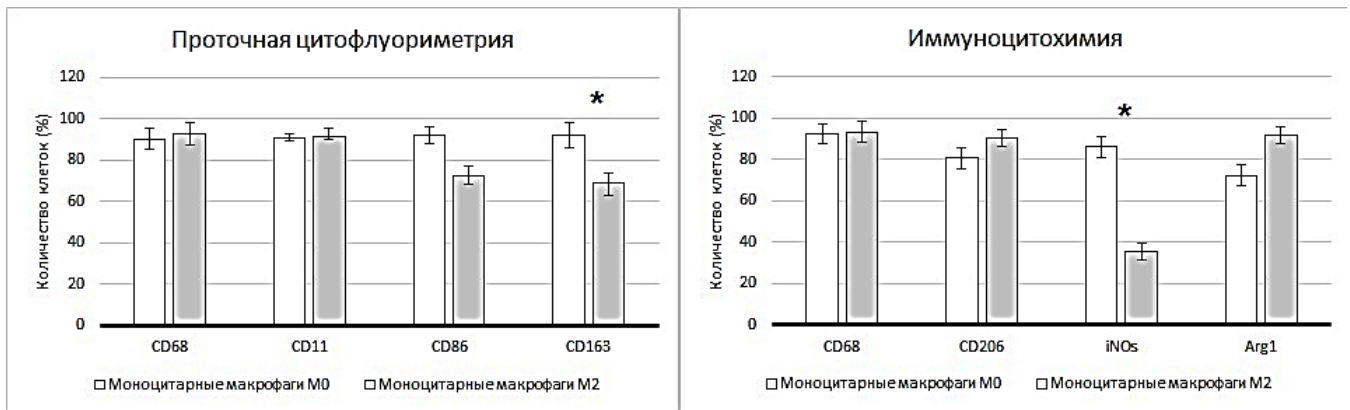


Рисунок 23. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD163, CD206, iNOs, Arg1 в костномозговых (моноцитарных) макрофагах без воздействия факторов активации (M0) и активированных по M2-фенотипу (M2). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Под влиянием факторов, активирующих M2 фенотип, статистически значимой разницы в экспрессии маркеров CD68, CD163 CD206 и Arg1 в клетках Купфера и макрофагах костномозгового происхождения отмечено не было. Клеток, экспрессирующих CD11b, по-прежнему было достоверно больше в культурах костномозговых макрофагов ($91,5 \pm 3,9\%$) по сравнению с культурами клеток Купфера ($5,7 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$)). Клеток, несущих маркер CD86 (маркер M1 макрофагов), также было достоверно больше в культурах костномозговых макрофагов ($72,2 \pm 7,2\%$), чем в клетках Купфера ($20,7 \pm 3,6\%$ ($p < 0,05$)) (Рисунок 24).

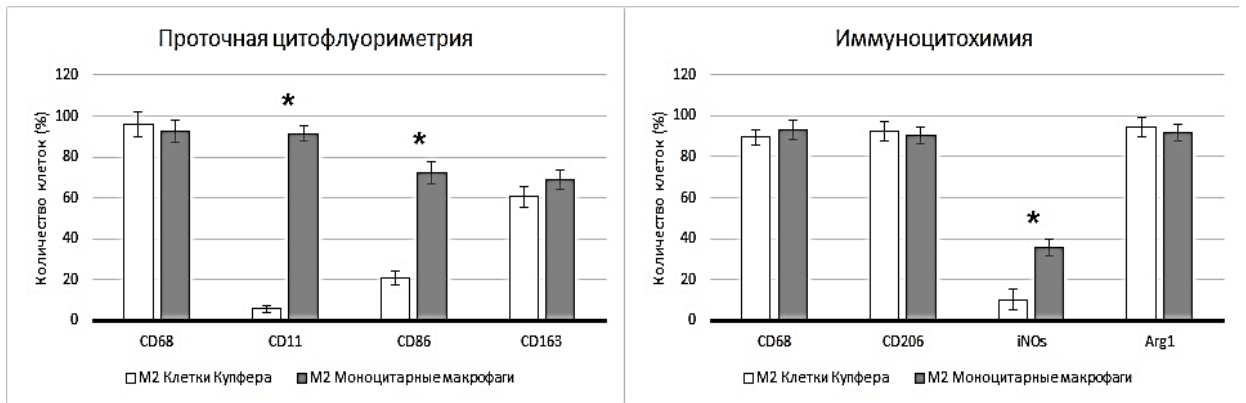


Рисунок 24. Экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD86, CD206, CD163, iNOs, Arg1 в клетках Купфера и макрофагах костномозгового (моноцитарного) происхождения, активированных по M2-фенотипу (M2). Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

Таким образом, при изучении фенотипа макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера было показано, что оба вида макрофагов отвечают на факторы, индуцирующие M1 и M2 поляризацию. Макрофаги костномозгового и эмбрионального происхождения одинаково реагируют на поляризующие среды изменением экспрессии iNOs и Arg1. Под влиянием активирующих факторов фенотип двух популяций макрофагов изменяется сходным образом: под влиянием M1-индуцирующих факторов в клетках активизируется синтез iNOs, под влиянием M2 – Arg1. Воздействие M1 и M2 сред не приводило к изменению уровня экспрессии общего маркера макрофагов CD68 и CD11b - маркера макрофагов костномозгового происхождения.

4.10. Морфология неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

В культуре макрофагов морфология клеток, прикрепившихся к пластику, зависит от источника их получения.

Костномозговые макрофаги, выделенные в первичную культуру, имеют округлую форму. Клетки Купфера после адгезии ко дну культурального пластика или стекла приобретают полигональную форму, треугольную, реже веретеновидную (Рисунки 25, 26).

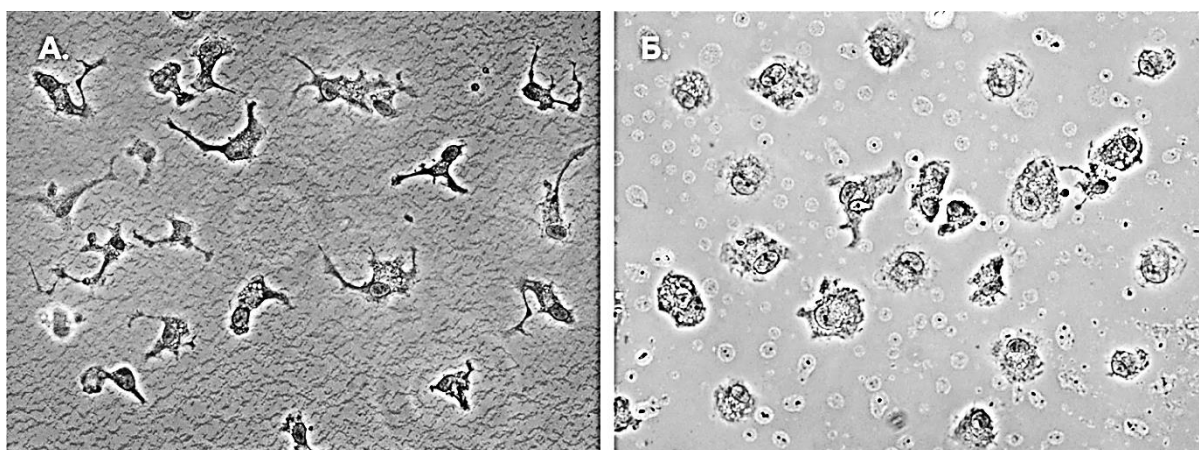


Рисунок 25. Морфология клеток Купфера (А) и костномозговых макрофагов (Б), выделенных в первичную культуру, 2-е сутки культивирования. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 200$

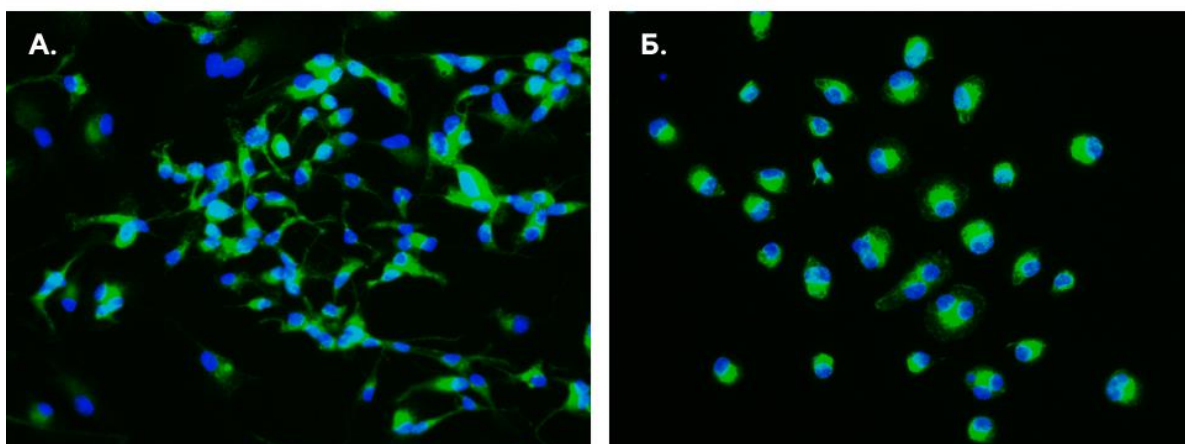


Рисунок 26. Морфология клеток Купфера (А) и костномозговых макрофагов (Б), выделенных в первичную культуру, 2 сутки культивирования, флуоресцентная микроскопия, экспрессия специфического пан-макрофагального маркера млекопитающих CD68 – зеленое свечение (FITC), докраска ядер DAPI – синее свечение, увеличение $\times 200$.

Морфология клеток под влиянием факторов активации M1 и M2 фенотипов незначительно изменялась. Клетки из обеих популяций – и костномозгового и эмбрионального происхождения - под действием факторов активации M1 фенотипа становились более отростчатыми, в то время как при культивировании в условиях факторов фенотипа M2 макрофаги становились округлыми.

4.11. Ультраструктура неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

Изучение ультраструктуры интактных M0 и поляризованных по классическому (M1) и альтернативному (M2) пути макрофагов различного происхождения проводили с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. Неактивированные M0 макрофаги и костномозгового и эмбрионального происхождения брали в исследование на 7 сутки

культивирования, клетки, активированные по M1 и M2 фенотипам, через 24 часа после воздействия поляризующих сред (Рисунок 27).

Макрофаги представляют собой гетерогенную клеточную популяцию. Анализ изображений, полученных с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии, выявил общие закономерности строения макрофагов разного происхождения (эмбрионального и костномозгового) и разного физиологического состояния (неактивированные M0-макрофаги и активированные по классическому M1 или альтернативному M2 пути). Клетки Купфера имеют неправильную полигональную, многоотростчатую форму, для отдельных клеток Купфера в культуре также типична звездчатая форма. Макрофаги костномозгового происхождения после адгезии к пластику более 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 у всех макрофагов 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 хорошо визуализируется гликокаликс. Митохондрии во всех типах изученных клеток немногочисленны, аппарат Гольджи и гранулярная эндоплазматическая сеть развиты умеренно.

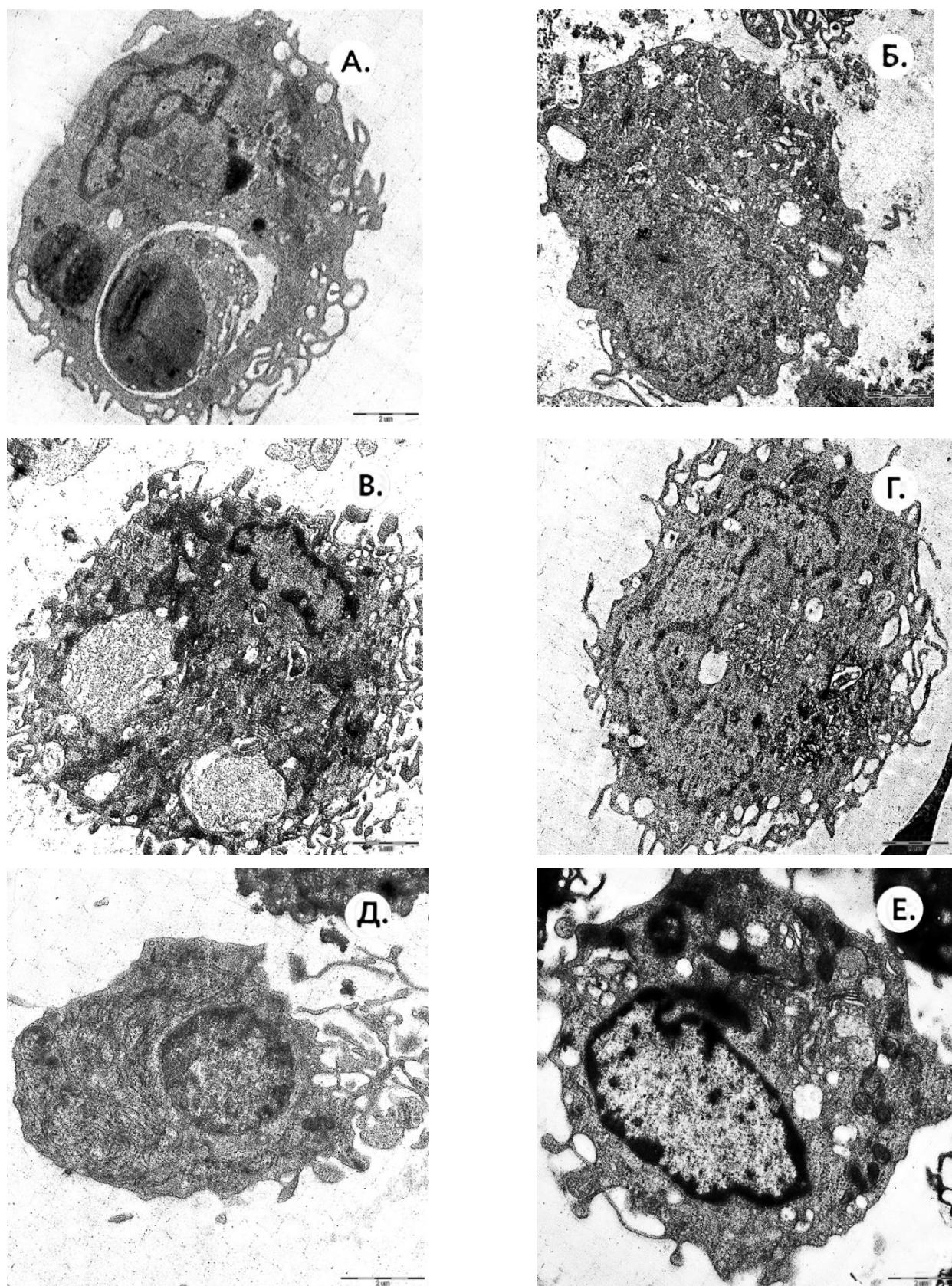


Рисунок 27. Трансмиссионная электронная микроскопия, масштабный отрезок – 2 мкм. А - клетка Купфера без воздействия активирующих факторов

(M0), Б - макрофаг костномозгового происхождения без воздействия активирующих факторов (M0), В - клетка Купфера, поляризация по M1-фенотипу, Г - макрофаг костномозгового происхождения, поляризация по M1-фенотипу, Д - клетка Купфера, поляризация по M2-фенотипу, Е - макрофаг костномозгового происхождения, поляризация по M2-фенотипу.

Так как изучаемые макрофаги независимо от происхождения и функционального статуса (M0, M1, M2) являются адгезионными, то все они формируют подосомы (короткоживущие структуры, богатые актином и матриксными мелаллопротеазами), от которых радиально отходят микрофиламенты, образуя трехмерную сеть. Сборка подосом в макрофагах осуществляется микротрубочками, которые также необходимы для стабилизации пояса подосом по периферии клетки [Linder и др., 2000]. Сливаясь, подосомы макрофагов имеют способность образовывать структуры более высокого порядка – розетки.

При культивировании макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера было обнаружено, что клетки не образуют монослоя в культуре, что затруднило постановку скретч-теста для оценки подвижности. При этом было показано, что добавление активирующих факторов вызывает незначительное изменение морфологии макрофагов. Под влиянием M1-индуцирующей среды клетки изменяли форму, появлялось множество псевдоподий, клетки становились звездчатыми. Эти данные согласуются с данными по изучению фагоцитоза и влиянию на этот процесс M1 и M2 индуцирующих сред.

Значительных ультраструктурных отличий, зависящих от происхождения и функционального статуса (M0, M1, M2) изучаемых клеток, отмечено не было (Рисунок 27).

4.12. Оценка уровня экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление неактивированных и поляризованных клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

Исследование проводили в первые сутки (через 24) и на 3 сутки (через 72 часа) после активации макрофагов M1 и M2 поляризующими средами. Относительную экспрессию оценивали по методу M. Pfaffl и J. Vandesompele.

Анализ профиля экспрессии изучаемых генов в культурах клеток позволил выявить отличия в ответе макрофагов костномозгового и эмбрионального происхождения на действие M1 и M2 индуцирующих факторов.

4.12.1. Экспрессия генов провоспалительных цитокинов

В макрофагах костномозгового происхождения отмечалась более быстрая и длительная индукция генов провоспалительных цитокинов по сравнению с макрофагами эмбрионального происхождения. Для костномозговых макрофагов индукция провоспалительных цитокинов наблюдалась как в культуре после воздействия M1, так и M2 индуцирующей среды. Прежде всего это характерно для генов *IL1 β* и *TNF α* . Для макрофагов костномозгового происхождения статистически значимое повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL1 β* и *TNF α* наблюдалась как в культуре с M1 поляризующей средой, так и M2 ($p < 0,05$). Следует отметить, что в случае активации по M1 фенотипу высокий уровень экспрессии сохранялся дольше, чем при воздействии M2 активирующей среды. Экспрессия гена *TNF α* в клетках Купфера достоверно возрастала только на 3 сутки под действием M1 среды ($p < 0,05$), на первые сутки роста экспрессия гена *TNF α* отмечено не было. Значимого изменения уровня *IL1 β* в макрофагах эмбрионального происхождения обнаружено не было ни на 1, ни на 3 сутки.

Динамика экспрессии гена *IL6* в макрофагах костномозгового происхождения и клетках Купфера была одинаковой. Индукция экспрессии гена *IL6* происходила уже через 1 сутки после воздействия среды, как в условиях М1, так и М2 поляризующих факторов. При этом стоит отметить, что неактивированные М0 макрофаги костномозгового происхождения отличались достоверно более высокой экспрессией гена *IL6* по сравнению с неактивированными М0 клетками Купфера. Уровень экспрессии гена *IL6* возрастал уже через 1 сутки после активации как и М1 и М2 активирующими средами ($p<0,05$), однако оставался повышенным в течение 3 суток только при воздействии М1 активирующих факторов ($p<0,05$).

Сходная динамика была характерна и для гена *IL12a* в макрофагах костномозгового происхождения при индукции как в М1, так и в М2 фенотип: повышение экспрессии отмечалось уже через 1 сутки, а в клетках Купфера только через 3 суток в условиях М1-индуцирующей среды. Экспрессия гена *IL12a* в костномозговых макрофагах возрастала при индукции как М1-фенотипа, так и в М2 направлении уже через 1 сутки ($p<0,05$), а в клетках Купфера только через 3 суток и только при воздействии М1 индуцирующей среды ($p<0,05$). Следует отметить, что неактивированные М0 макрофаги костномозгового происхождения отличались достоверно более высокой экспрессией генов *IL6* и *IL12a* по сравнению с неактивированными М0 клетками Купфера ($p<0,05$).

Экспрессия гена *IL18* в макрофагах костномозгового происхождения повышалась достоверно только под влиянием М1 индуцирующей среды ($p<0,05$), в то время как в клетках Купфера экспрессию гена стимулировали оба типа индуцирующих сред: и М1, и М2. В клетках Купфера экспрессия гена *IL18* также достоверно повышалась под влиянием индукторов как М1, так и М2 фенотипа (Рисунок 28).

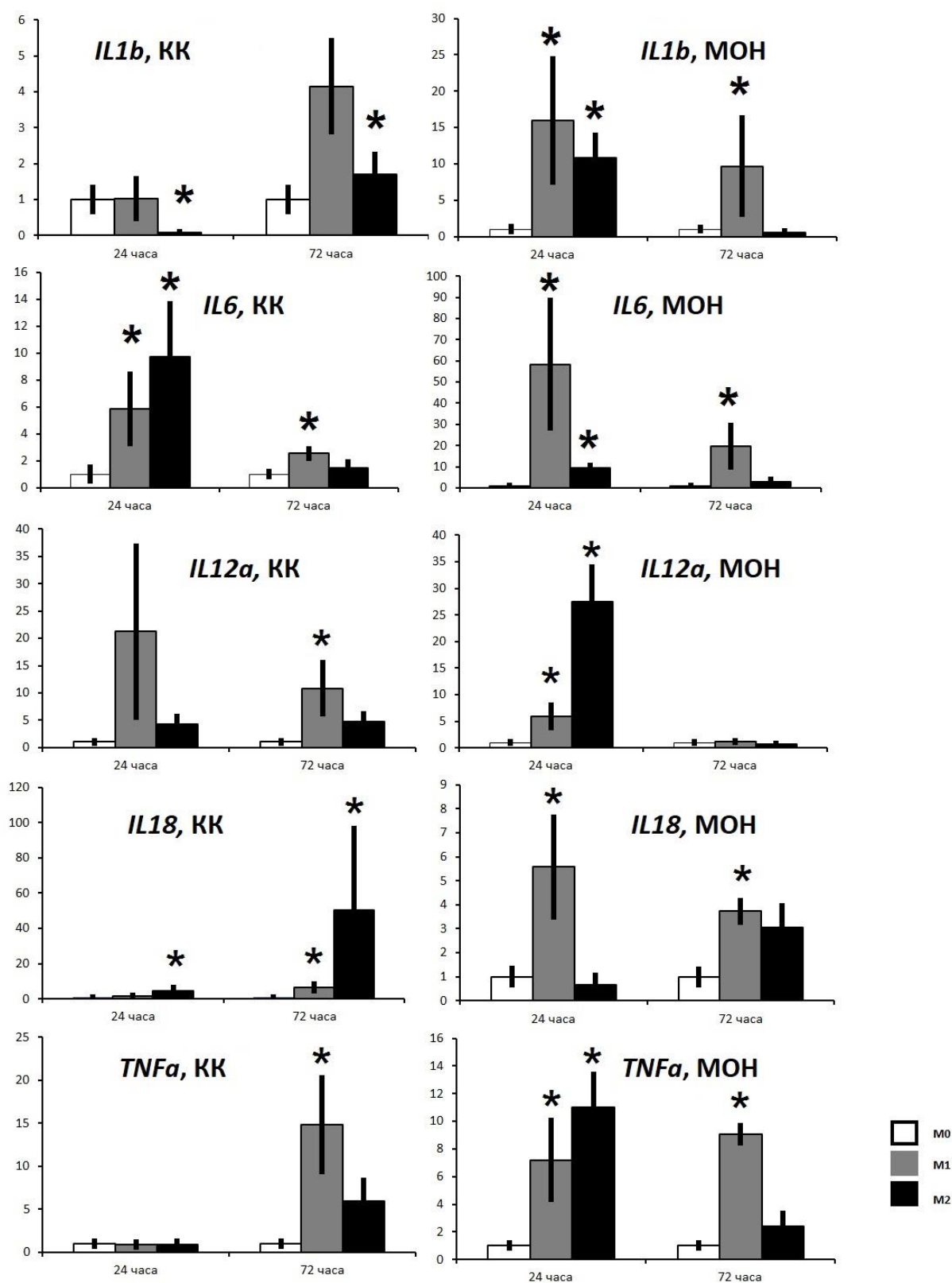


Рисунок 28. Профиль экспрессии генов провоспалительных цитокинов в неактивированных M0 и активированных (M1, M2) культурах макрофагов костномозгового (моноцитарного) происхождения (MOH) и клеток Купфера (KK) через 24 и 72 часа после воздействия факторов активации. По осям абсцисс –

уровень относительной экспрессии, по осям ординат – время. *- статистически значимые различия по сравнению с неактивированными макрофагами, $p < 0,05$.

4.12.2. Экспрессия генов противовоспалительных цитокинов

При рассмотрении экспрессии генов противовоспалительных цитокинов было обнаружено, что в клетках Купфера повышение экспрессии происходит быстрее и на более продолжительный период, чем в макрофагах костномозгового происхождения. Так, например, статистически значимое повышение экспрессии генов противовоспалительных цитокинов *IL4* и *IL13* обнаруживалось только в клетках Купфера, в костномозговых макрофагах экспрессия этих генов отсутствовала.

Статистически значимое повышение ($p < 0,05$) экспрессии гена противовоспалительного цитокина *IL4* было выявлено только в клетках Купфера. Экспрессия гена *IL4* через 24 часа после активации повышалась даже при воздействии на эмбриональные макрофаги М1 поляризующей среды, а через 3 суток после воздействия как М1 так и М2 активирующих сред. Экспрессия гена *IL13* в клетках Купфера была повышена и на первые сутки, и через 3 суток после индуцирующего влияния в направлении как М1, так и М2 фенотипа. В макрофагах костномозгового происхождения экспрессия гена *IL13* краткосрочно возрастала в первые 24 часа и только под влиянием М2 индуцирующих факторов ($p < 0,05$).

Воздействие индуцирующих сред приводило к повышению экспрессии гена *IL10* как в макрофагах костномозгового происхождения, так и эмбрионального. При этом в клетках Купфера достоверное повышение экспрессии гена *IL10* отмечалось через 24 часа при воздействии М2 активирующей среды ($p < 0,05$), а через 72 часа и при воздействии М1 активирующих факторов. В макрофагах костномозгового происхождения повышение экспрессии гена *IL10* было выявлено только через 24 часа после активации по М1 фенотипу (Рисунок 29).

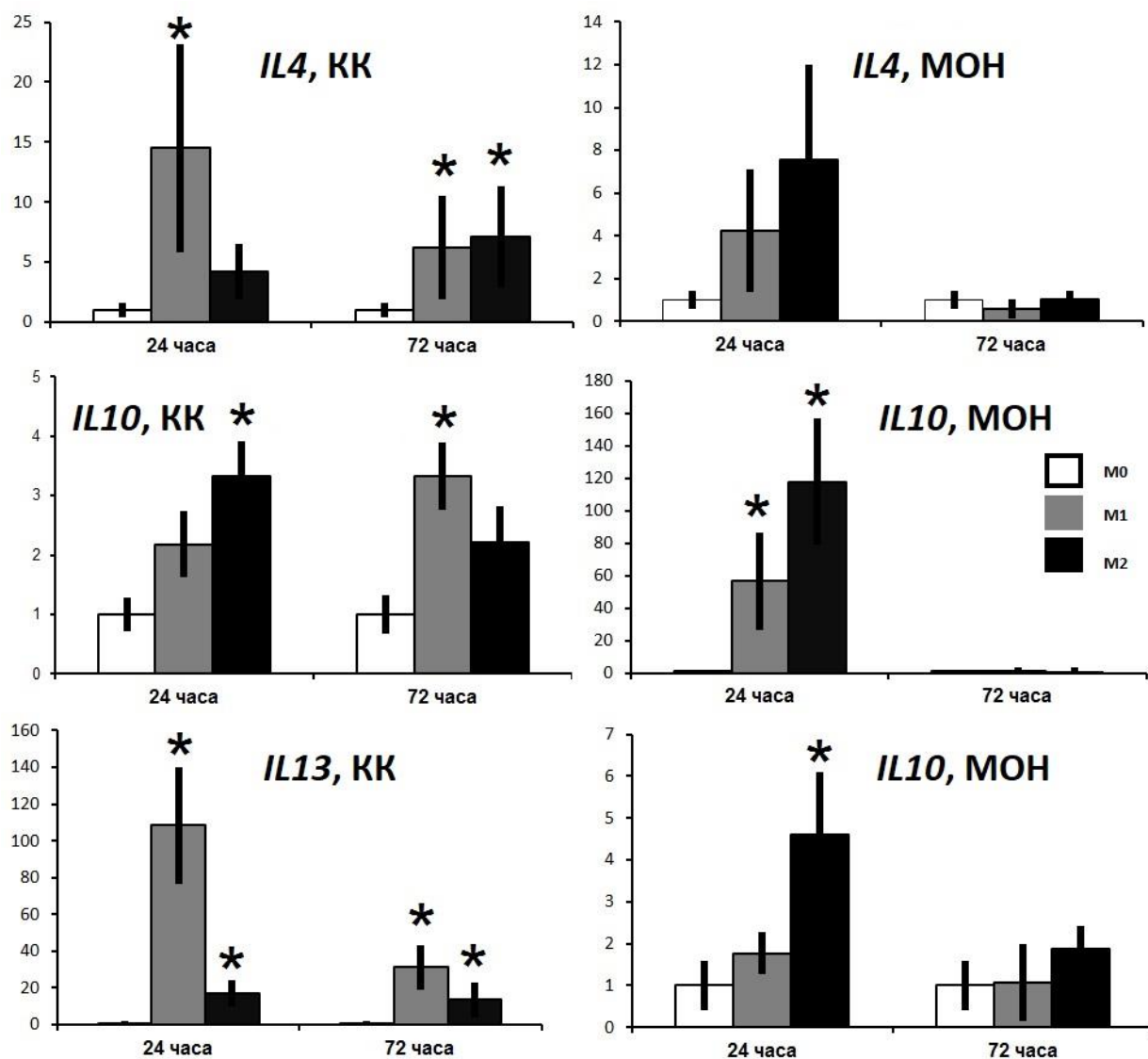


Рисунок 29. Профиль экспрессии генов противовоспалительных цитокинов в неактивированных M0 и активированных (M1, M2) культурах макрофагов костномозгового (моноцитарного) происхождения (МОН) и клеток Купфера (KK) через 24 и 72 часа после воздействия факторов активации. По осям абсцисс – уровень относительной экспрессии, по осям ординат – время. *- статистически значимые различия по сравнению с неактивированными макрофагами, $p < 0,05$.

4.12.3. Экспрессия генов - маркеров M1 и M2 поляризации

При изучении экспрессии генов основных маркеров M1- и M2 поляризации макрофагов были установлены следующие закономерности: уровень экспрессии гена *Arg1* был статистически значимо выше в неактивированной M0 культуре клеток Купфера по сравнению с неактивированными M0 макрофагами костномозгового происхождения ($p < 0,05$). Влияние индуцирующих сред, активирующих как M1, так и M2 фенотип, вызывала слабое, но достоверное повышение экспрессии *Arg1* как в клетках Купфера, так и костномозговых макрофагах. При этом через 24 часа экспрессия гена *Arg1* в культуре с M2 активирующими факторами была достоверно выше, чем в культуре с M1 средой ($p < 0,05$). На первые сутки экспрессия гена *Arg1* в культуре клеток Купфера, активированных по M2 фенотипу, была достоверно выше, чем в культуре, активированной по M1 пути. В культурах макрофагов костномозгового происхождения влияние индуцирующей среды M1 вызывало слабое и недостоверное повышение экспрессии гена *Arg1* по сравнению с M2 средой и неактивированными M0 культурами. Воздействие сред, активирующих M1 и M2 фенотипы, на 3 сутки культивирования не вызывало достоверных изменений в экспрессии гена *Arg1*.

Влияние индуцирующих сред вызывало более длительную повышенную экспрессию гена *iNOs* в макрофагах костномозгового происхождения как через 24 часа, так и на 3 сутки после активации. При этом ген *iNOs* экспрессировался только при влиянии M1 поляризующей среды. В клетках Купфера возрастание уровня экспрессии гена *iNOs* выявляли только через 3 суток после воздействия активирующей среды, при этом статистически значимое повышение экспрессии отмечалось как в условиях активации M1 фенотипа, так и в условиях M2 поляризации (Рисунок 30).

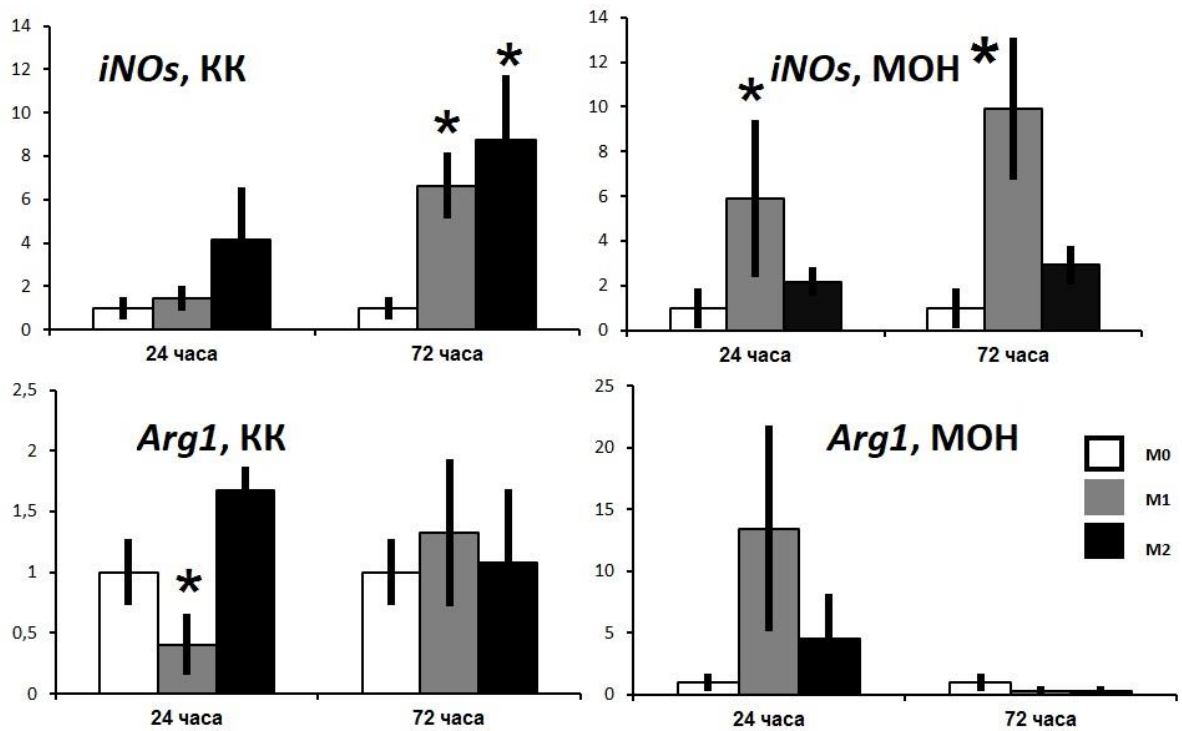


Рисунок 30. Профиль экспрессия генов маркеров M1 и M2 поляризации в неактивированных M0 и активированных (M1, M2) культурах макрофагов костномозгового (моноцитарного) происхождения (MOH) и клеток Купфера (KK) через 24 и 72 часа после воздействия факторов активации. По осям абсцисс – уровень относительной экспрессии, по осям ординат – время. *- статистически значимые различия по сравнению с неактивированными макрофагами, $p < 0,05$.

Динамика экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL12b* и *IL23*, факторов миграции клеток – матричных металлопротеиназ *MMP2* и *MMP9*, тканевых эндогенных ингибиторов матричных металлопротеиназ *TIMP1* и *TIMP2*, а также гена пан-макрофагального маркера *CD68* в макрофагах костномозгового происхождения и клетках Купфера была сходна и достоверно не различалась.

Воздействие сред, активирующих как M1, так и M2 фенотип, не вызывало достоверных изменений в экспрессии таких генов как: *IL12b*, *IL23*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *CD68* в макрофагах костномозгового происхождения ни через 24 часа, ни на 3 сутки после воздействия активирующих сред. В клетках Купфера, поляризованных и по M1, и по M2 пути, статистически значимых различий в

экспрессии генов *IL12b*, *IL23*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *CD68* также отмечено не было ни на одном из сроков.

Таким образом, для макрофагов костномозгового и эмбрионального происхождения характерен разный паттерн экспрессии провоспалительных и противовоспалительных генов. В макрофагах эмбрионального происхождения независимо от факторов, активирующих M1 и M2 фенотипы, и в неактивированных культурах гены противовоспалительных цитокинов – *IL4*, *IL10*, *IL13*, *Arg1* экспрессируются достоверно выше, чем в макрофагах костномозгового происхождения. В костномозговых макрофагах независимо от факторов, активирующих M1 и M2 фенотипы, и в интактных M0 культурах достоверно выше экспрессируются гены провоспалительных цитокинов *IL1 β* , *IL12 α* , *TNF α* , *iNOs*. Также следует отметить, что макрофаги костномозгового происхождения отвечают на воздействие индуцирующих сред быстрее, чем клетки Купфера.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что макрофаги эмбрионального происхождения – клетки Купфера по свойствам приближены к макрофагам с противовоспалительным M2-фенотипом, а макрофаги костномозгового происхождения – к макрофагам с провоспалительным M1-фенотипом.

4.13. Полуколичественный анализ секреции сигнальных молекул в кондиционированной среде неактивированных и поляризованных клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

Полуколичественный анализ содержания белков TNF α , IL1 β , IL6, IL10 в образцах проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Для изучения содержания белков использовали кондиционированную среду от культур макрофагов разного происхождения (костномозгового и эмбрионального) после воздействия сред, активирующих клетки в направлении и M1 и M2 фенотипов, которые отбирали через 1 сутки (24 часа) и 3 суток (72 часа) после активации макрофагов.

При определении концентрации IL1 β в культуральной среде от макрофагов обнаружено, что в среде клеток Купфера концентрация IL1 β статистически значимо повышалась только под влиянием M1-индуцирующих факторов через 3 суток после активации ($p < 0,05$). Через 24 часа после активации как M1 так и M2 поляризующими факторами разницы в концентрации IL1 β по сравнению с M0 клетками Купфера отмечено не было. При изучении продукции IL1 β макрофагами костномозгового происхождения разница между группами как через 24 часа, так и на 3 сутки активации, при воздействии факторов и M1 и M2 фенотипа 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 в культуре костномозговых макрофагов только через 24 часа после активации ($p < 0,05$), при этом в клетках Купфера повышение происходило под влиянием M2-активаторов, а в костномозговых макрофагах - M1-активаторов. На 3 сутки воздействия факторами как M1 так и M2 активации в культурах макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения разницы в продукции IL6 и IL10 в сравнении с неактивированными клетками отмечено не было.

Характер продукции $\text{TNF}\alpha$ в культурах макрофагов костномозгового происхождения и клетках Купфера различался. В кондиционированных средах, полученных от клеток Купфера после активации M1-факторами и M2-факторами, отличия в содержании $\text{TNF}\alpha$ в сравнении с неактивированными клетками отсутствовали как на первые, так и на 3 сутки эксперимента ($p < 0,05$). В культуре костномозговых макрофагов продукция $\text{TNF}\alpha$ значимо увеличивалась через 24 часа после активации M2-индуцирующими факторами ($p < 0,05$). При воздействии M1-поляризующих сред на первые сутки различий отмечено не было (Рисунок 31). Через 3 суток различия в содержании $\text{TNF}\alpha$ в сравнении с неактивированными макрофагами – производными моноцитов крови, не зависимо от условий M1 или M2 активации, также отмечено не было.

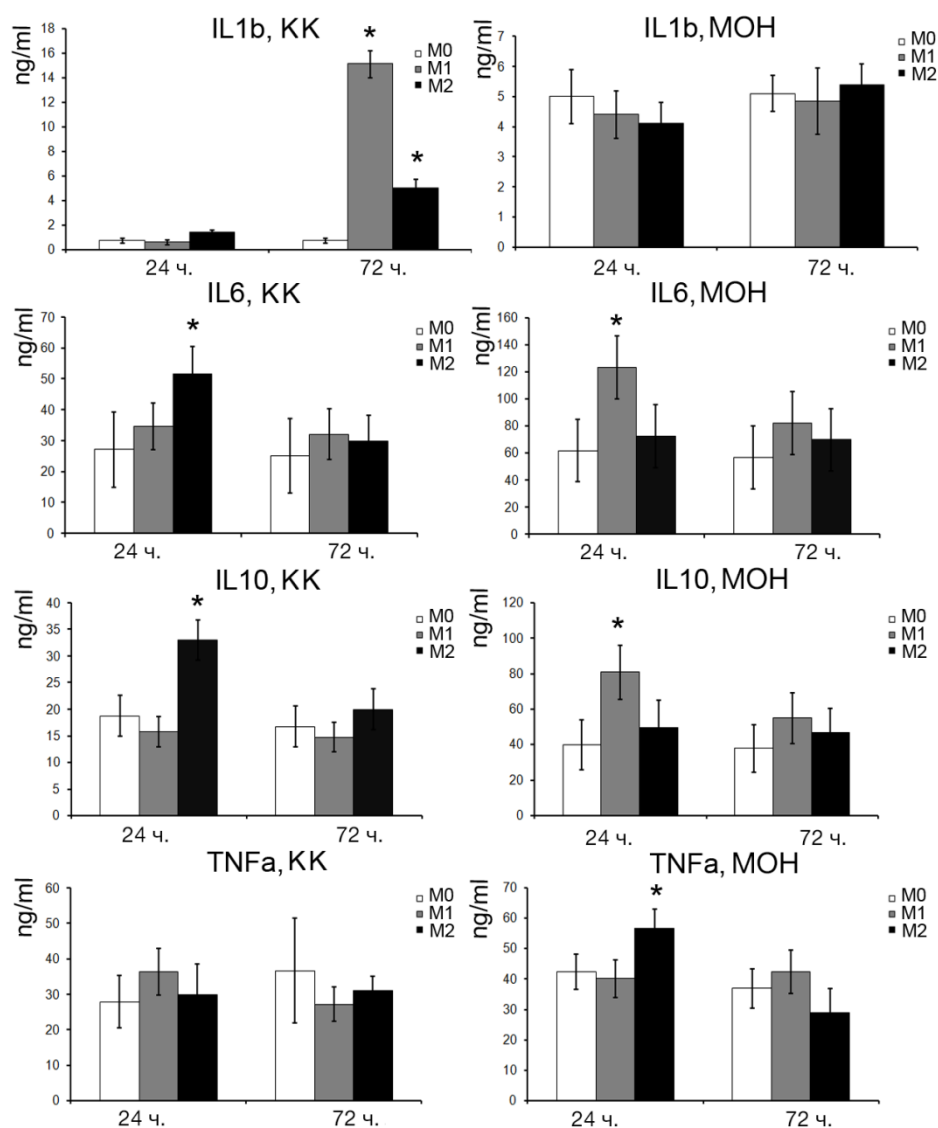


Рисунок 31. Динамика продукции (в нг/мл) сигнальных молекул TNF α , IL1 β , IL6, IL10 в кондиционированной среде неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 пути клеток Купфера (KK) и макрофагов Костномозгового (моноцитарного) происхождения (MOH). По осям абсцисс - динамика продукции в нг/мл, по осям ординат – время *- статистически значимые различия по сравнению с кондиционированной средой неактивированных клеток, $p < 0,05$.

Таким образом, характер секреции белков TNF α , IL1 β , IL6, IL10 в кондиционированных средах неактивированных M0 и поляризованных по M1 или M2 фенотипу клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

отличался. Синтез провоспалительных (IL1 β , IL6, TNF α) и противовоспалительных (IL10) цитокинов не всегда зависел от активации по M1 или M2 фенотипу и имел разную динамику для макрофагов разного происхождения.

4.14. Исследование функциональных характеристик неактивированных и поляризованных по M1 и M2 фенотипам клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения

4.14.1. Изучение фагоцитарной активности методом прижизненной фазово-контрастной микроскопии

Метод основан на способности макрофагов *in vitro* фагоцитировать латексные частицы размером 1,5 мкм. В культуры неактивированных M0 клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения латексные частицы вносили на 7 сутки культивирования по стандартному протоколу. В культуры макрофагов, активированных по классическому M1 или альтернативному M2 пути, суспензию латексных бусин вносили спустя 24 часа после активации.

Внесение суспензии латексных частиц для оценки фагоцитарных способностей в культуры клеток на жизнеспособность и стабильность клеток не повлияло. Учет результатов осуществляли методом прижизненной фазово-контрастной микроскопии через 1, 2, 5 и 24 часа после внесения в культуры суспензии латексных частиц. В каждой из исследуемых групп клеток (интактные M0 и активированные по M1 и M2 пути макрофаги разного происхождения) подсчитывали фагоцитарное число - количество поглощенных латексных частиц на одну клетку (Рисунки 32-37).

При сравнении фагоцитарной активности неактивированных M0 макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера было обнаружено, что через 1 час после добавления в культуральную среду латексных частиц

костномозговые макрофаги начинали статистически значимо активнее поглощать их в отличие от клеток Купфера. Далее происходило постепенное нарастание фагоцитарной активности клеток Купфера, и через 2 часа после начала эксперимента различий в фагоцитарной активности эмбриональных и костномозговых макрофагов уже не было отмечено. Однако через 5 часов уровень фагоцитоза у клеток Купфера резко превысил таковой у макрофагов костномозгового происхождения. Через 24 часа после начала эксперимента различий в фагоцитарной активности макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения уже не было отмечено.

Активация факторами M1- и M2-фенотипа приводила к повышению фагоцитарной активности как у макрофагов костномозгового происхождения, так и у клеток Купфера. При этом наибольшее активирующее влияние на фагоцитарную активность оказывали факторы, вызывающие поляризацию по M1-фенотипу. Следует отметить, что в макрофагах костномозгового происхождения влияние M1-индуцирующей среды поддерживало фагоцитарную активность на достоверно более высоком уровне по сравнению с неактивированными клетками более длительное время. Статистически значимые различия были выявлены через 5 часов после начала эксперимента. В клетках Купфера через 5 часов после начала эксперимента разница между активированными по M1 фенотипу и неактивированными M0 клетками отсутствовала.

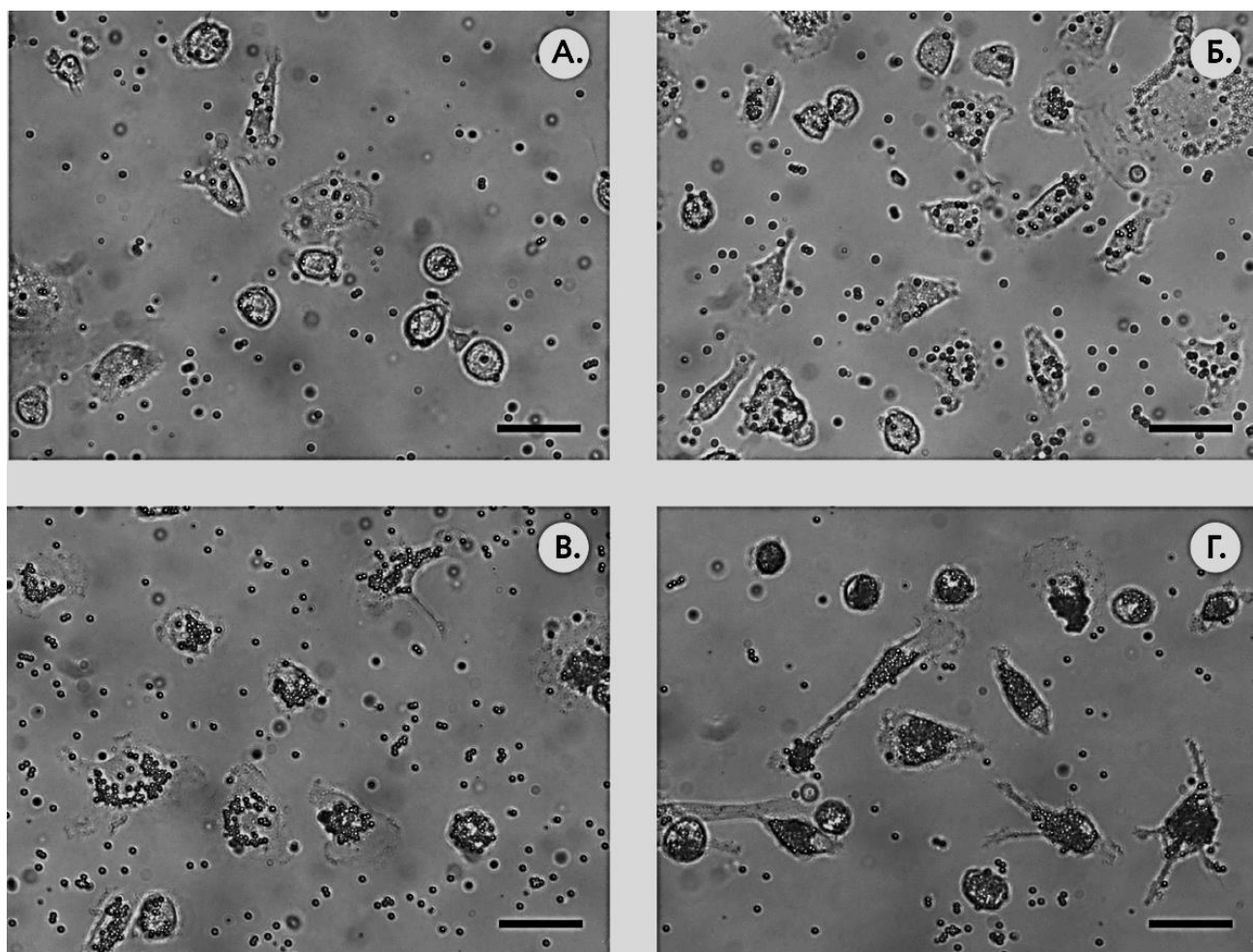


Рисунок 32. Фагоцитарная активность макрофагов костномозгового происхождения, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

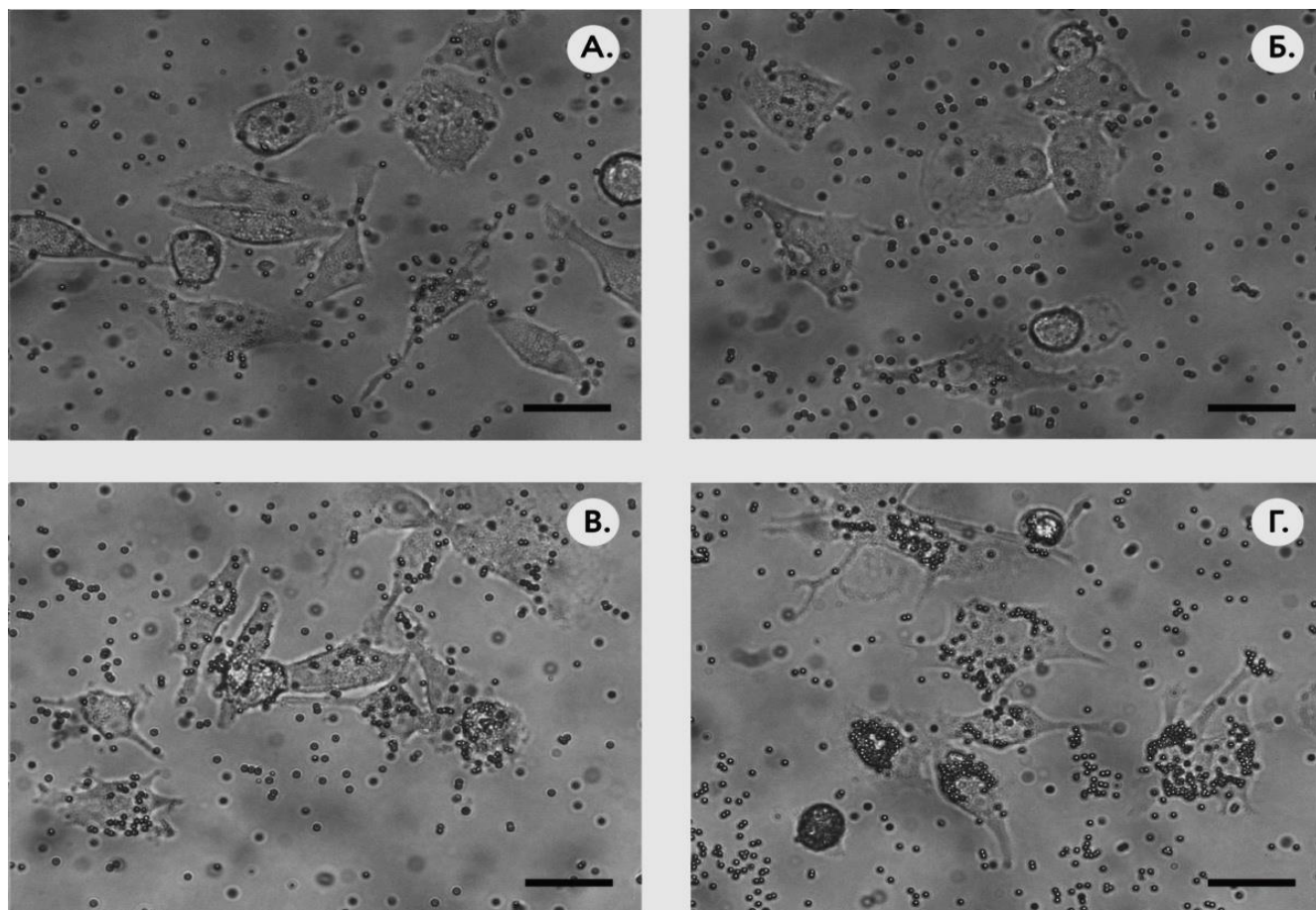


Рисунок 33. Фагоцитарная активность клеток Купфера, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

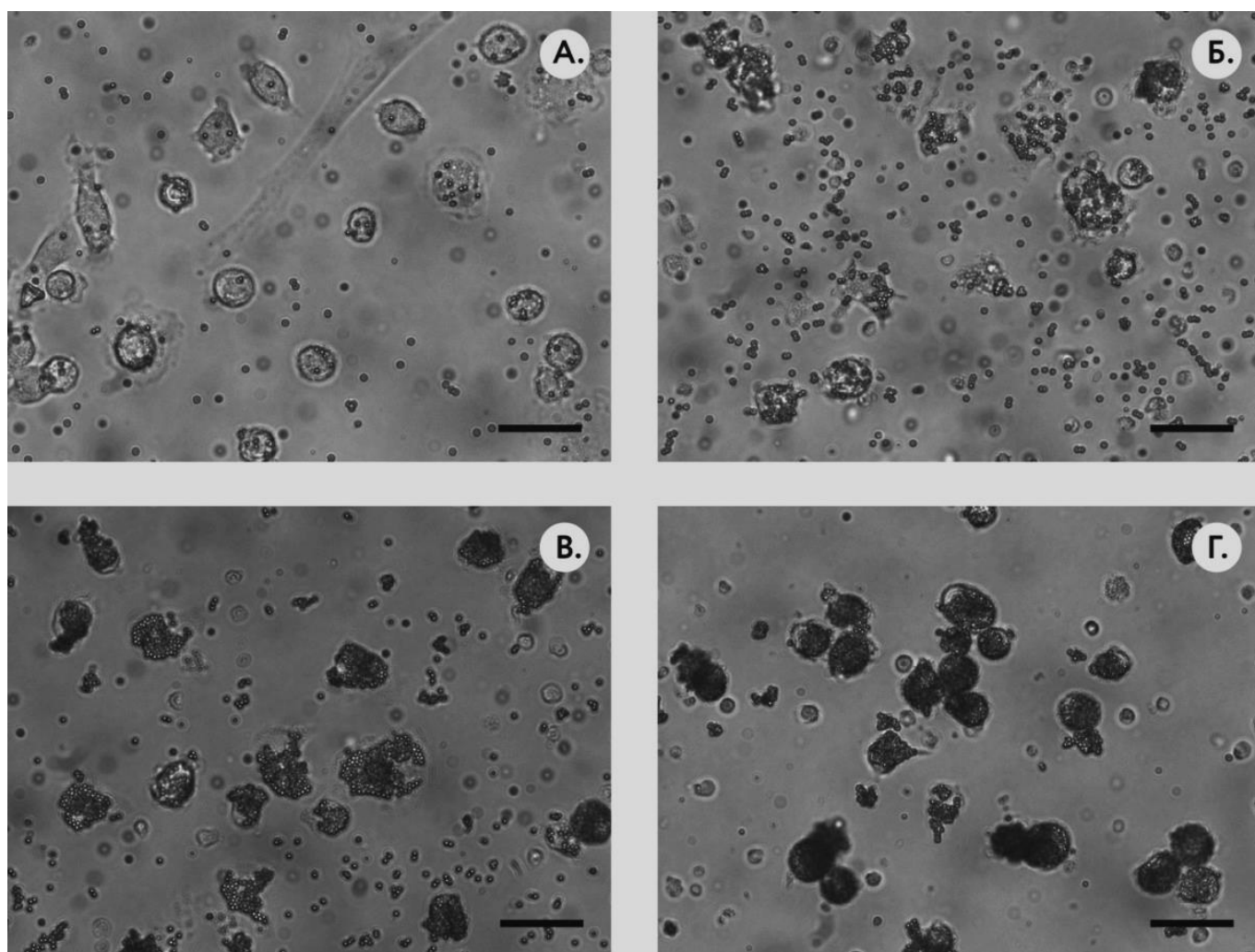


Рисунок 34. Фагоцитарная активность клеток Купфера, активированных по М1 фенотипу, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

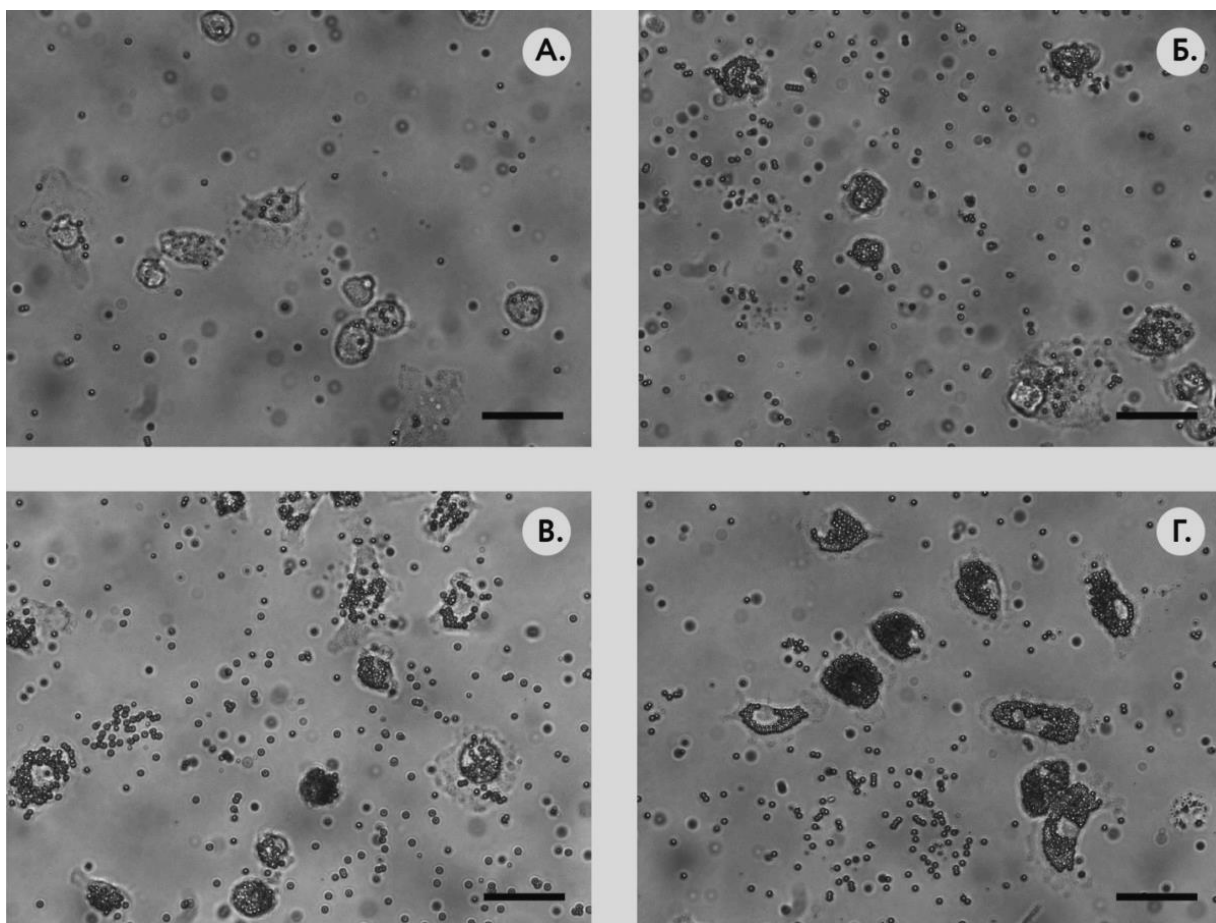


Рисунок 35. Фагоцитарная активность клеток Купфера, активированных по М2 фенотипу, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

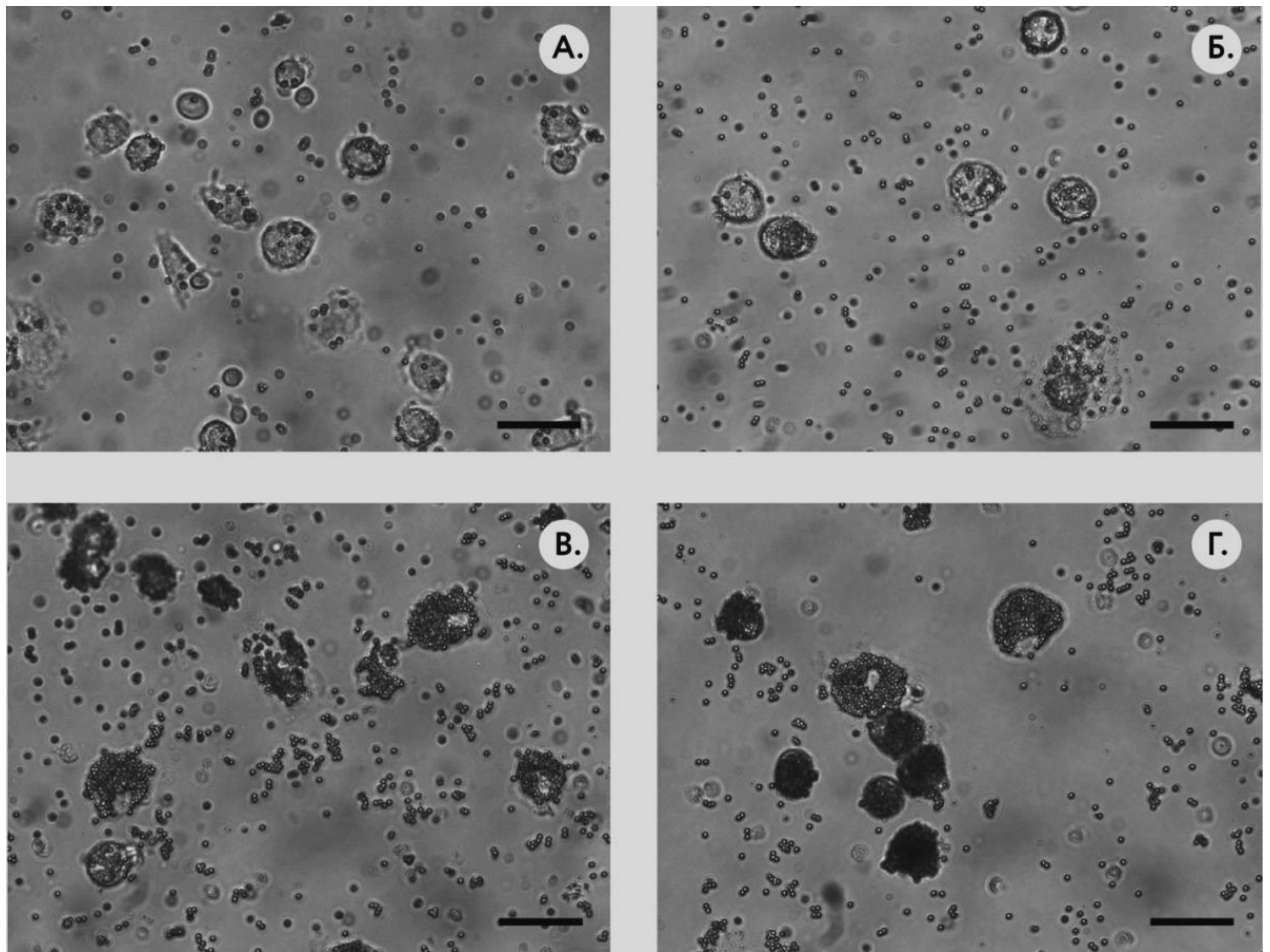


Рисунок 36. Фагоцитарная активность макрофагов костномозгового происхождения, активированных по М1 фенотипу, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

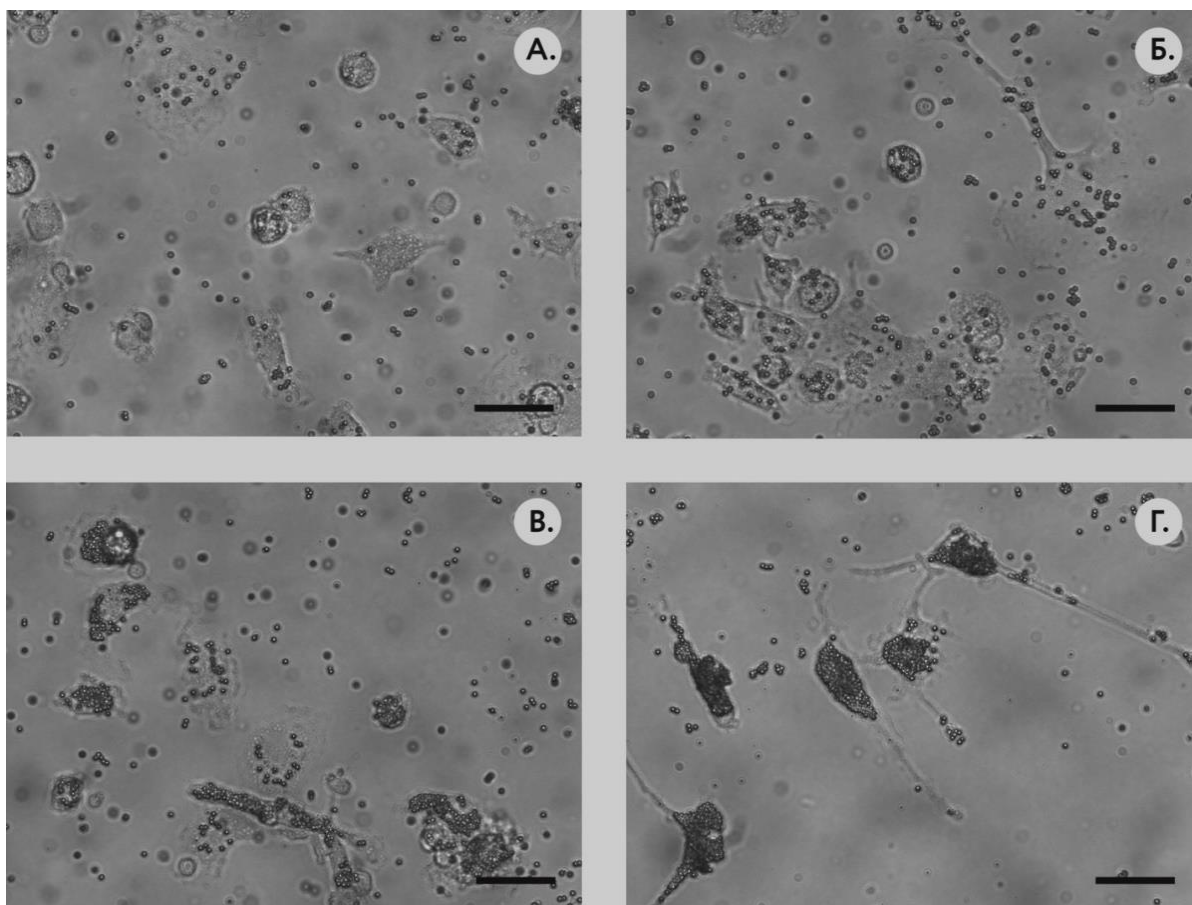


Рисунок 37. Фагоцитарная активность макрофагов костномозгового происхождения, активированных по M2 фенотипу, фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок – 50 мкм. А – культура клеток через 1 час после внесения суспензии латексных частиц; Б – через 2 часа; В – через 5 часов; Г – через 24 часа.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что макрофаги костномозгового происхождения изначально обладают более выраженной фагоцитарной активностью по сравнению с макрофагами эмбрионального происхождения, однако клетки Купфера ко второму часу эксперимента переходят к высокой фагоцитарной активности, которая превышает таковую у костномозговых макрофагов. Активное наращивание фагоцитарной активности, очевидно, быстрее истощает потенциал к фагоцитозу у клеток Купфера, что приводит к снижению их фагоцитарной способности у неактивированных клеток

к 5 часам после начала эксперимента, в то время как у макрофагов костномозгового происхождения продолжается усиление фагоцитарной активности (Рисунок 38).

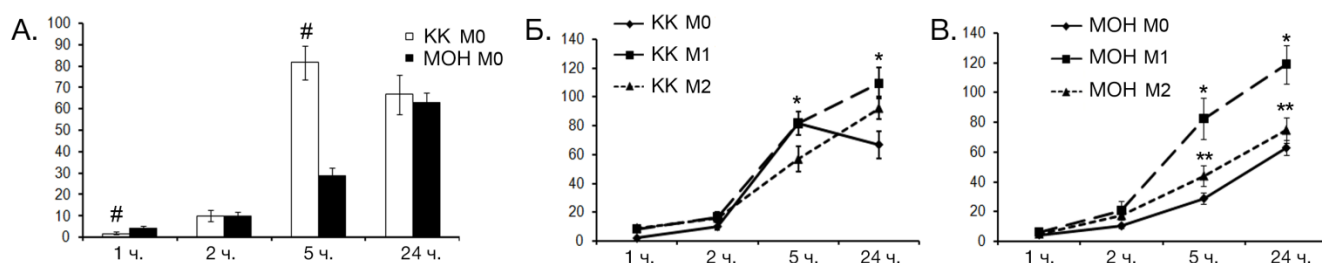


Рисунок 38. Фагоцитарная активность неактивированных М0 и поляризованных (М1, М2) клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения. А - фагоцитарная активность интактных клеток Купфера по сравнению с интактными костномозговыми макрофагами; Б - фагоцитарная активность интактных и активированных клеток Купфера; В - фагоцитарная активность интактных и активированных макрофагов костномозгового происхождения; КК М0 – интактные клетки Купфера, КК М1 – клетки Купфера, активированные по М1 фенотипу, КК М2 - клетки Купфера, активированные по М2 фенотипу, МОН М0 – интактные макрофаги костномозгового (моноцитарного) происхождения, МОН М1 - макрофаги костномозгового (моноцитарного) происхождения, активированные по М1 фенотипу, МОН М2 – макрофаги костномозгового (моноцитарного) происхождения, активированные по М2 фенотипу, по осям абсцисс - количество фагоцитированных частиц на 1 клетку, по осям ординат – время; *- статистически значимые различия по сравнению с интактными культурами клеток, $p < 0,05$; # - статистически значимые различия фагоцитарной активности клеток Купфера по сравнению с костномозговыми (моноцитарными) макрофагами, $p < 0,05$. Данные представлены в виде средней $\pm$ стандартное отклонение.

4.14.2. Изучение фагоцитарной активности по скорости поглощения макрофагами частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green

Изучение поглощения частиц зимозана (смесь нерастворимых в воде полисахаридов клеточных оболочек дрожжей), конъюгированных с pHrodo™ Green (маркер адификации фагосом) (Thermo Fisher, USA) дает возможность оценить зрелость эндосом, образовавшихся в ходе фагоцитоза. Указанный краситель в нейтральной среде не дает флуоресцентного свечения, которое появляется только при снижении pH до 5,0. Для проведения исследования макрофаги культивировали в специализированных 96-луночных планшетах Glass Bottom Viewplate-96, PN 6005430 - black, TC-treated (PerkinElmer, Inc). Интенсивность флуоресценции в каждой лунке измеряли через 2, 4, 6 и 24 часа после внесения частиц.

Суспензию частиц зимозана, конъюгированных с pHrodo™ Green, вносили в культуры неактивированных M0 клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения на 7 сутки культивирования по стандартному протоколу. В культуры макрофагов, активированных по M1 или M2 фенотипам, частицы вносили через 24 часа после воздействия поляризующих сред. Внесение суспензии частиц зимозана в культуры клеток не влияло на стабильность и жизнеспособность макрофагов.

Экспериментами по фагоцитозу макрофагами разного происхождения (эмбриональные и костномозговые) и функционального состояния (M0, M1 и M2) латексных частиц установлено, что добавление в культуральную среду факторов активации M1 или M2 фенотипа вызывает увеличение фагоцитарной активности и в клетках Купфера, и в костномозговых макрофагах. Изучение фагоцитарной активности по скорости поглощения макрофагами частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green, позволил оценить фагоцитоз в этих клетках на качественном уровне.

Было продемонстрировано, что на качественном уровне фагоцитоз как в клетках Купфера, так и макрофагах костномозгового происхождения не зависимо от их функционального состояния (M0, M1 и M2) протекает с формированием полноценных зрелых эндосом с кислой средой (pH меньше 5,0). На это указывают данные по поглощению частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green. Различия в интенсивности флуоресценции, измеренной с помощью прибора Cytation 3 MFV, через 2 часа после внесения частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green, между эмбриональными и костномозговыми макрофагами отсутствовали. Через 4, 6 и 24 часа после внесения частиц зимозана достоверных отличий между культурами клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения также не было выявлено. Факторы поляризации M1 и M2 фенотипа на скорость поглощения частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green, клетками Купфера и макрофагами костномозгового происхождения не влияли (Рисунок 39).

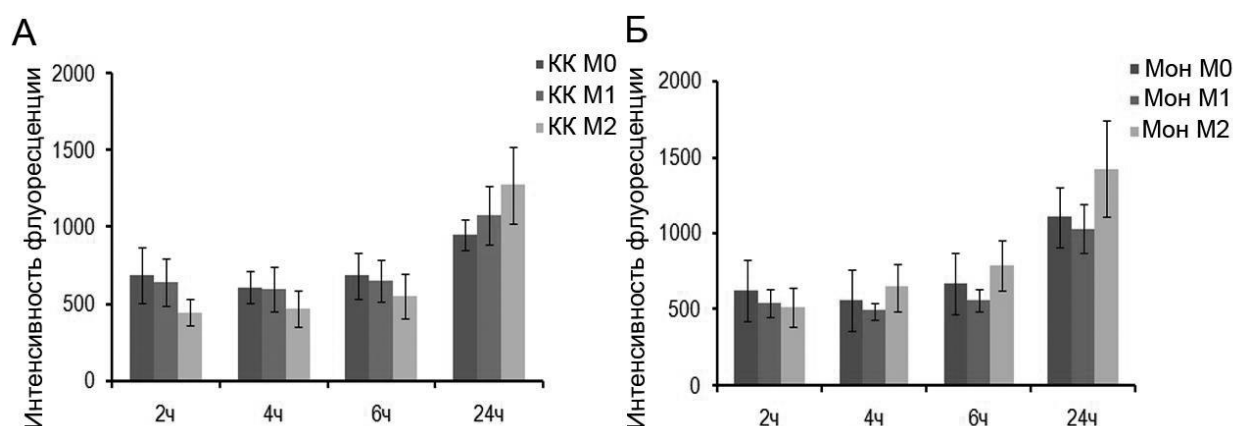


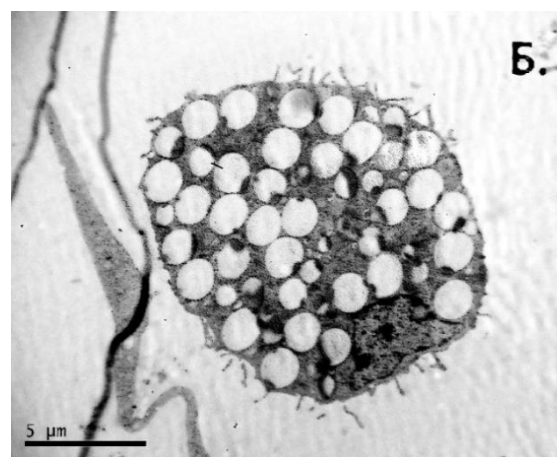
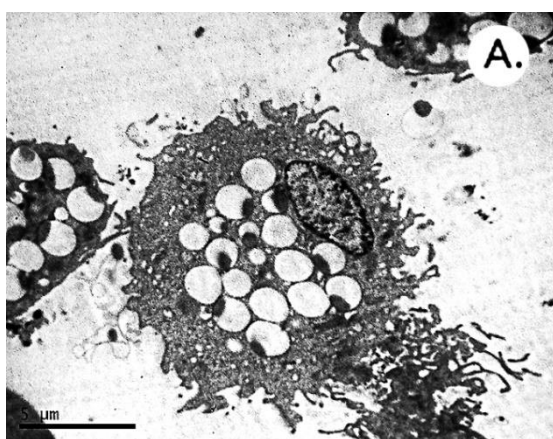
Рисунок 39. Интенсивность флуоресценции при поглощении частиц зимозана, конъюгированного с pHrodo™ Green: А – фагоцитарная активность клеток Купфера, Б - фагоцитарная активность макрофагов костномозгового происхождения, ось ординат – интенсивность флуоресценции в условных единицах, ось абсцисс – время после внесения частиц в среду. КК – клетки Купфера, Мон – макрофаги костномозгового (моноцитарного) происхождения, M0 – макрофаги без воздействия факторов активации, M1 – макрофаги,

поляризованные по M1 фенотипу, M2 – макрофаги, поляризованные по M1 фенотипу.

Таким образом, фагоцитоз в неактивированных M0 и поляризованных по M1 и M2 фенотипу клетках Купфера и макрофагах костномозгового происхождения протекает с формированием полноценных зрелых эндосом с кислой средой.

4.14.3. Изучение морфологических особенностей фагоцитирующих макрофагов методом трансмиссионной электронной микроскопии

Ультраструктуру фагоцитирующих клеток изучали с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. Неактивированные M0 макрофаги и костномозгового и эмбрионального происхождения, а также клетки, активированные по M1 и M2 фенотипам, брали в исследование через 24 часа после внесения в культуры суспензии латексных частиц (Рисунок 40).



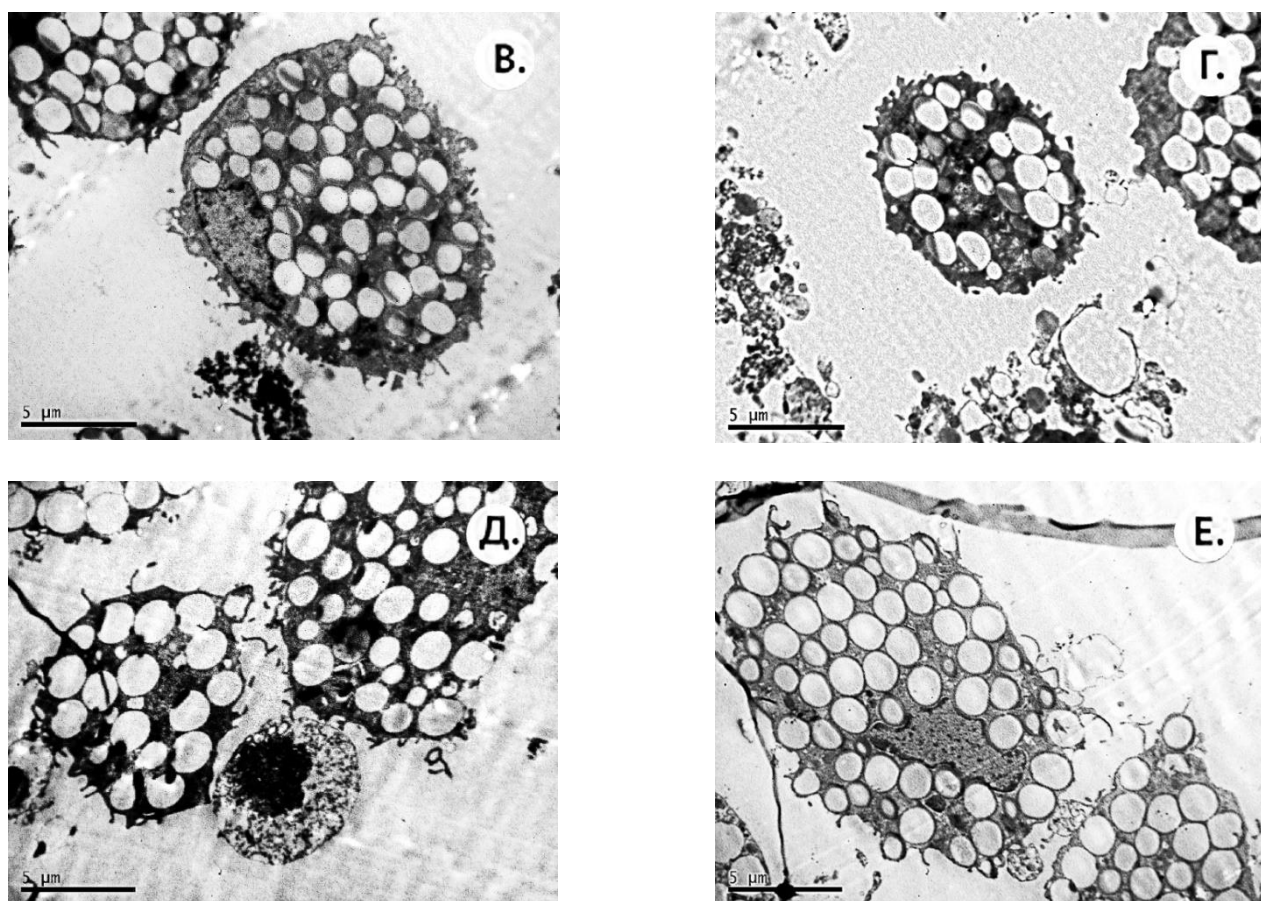


Рисунок 40. Ультраструктура клеток. Поглощение латексных частиц макрофагами, масштабный отрезок – 5 мкм. Трансмиссионная электронная микроскопия. А - клетка Купфера без воздействия активирующих факторов (M0); Б - макрофаг костномозгового происхождения без воздействия активирующих факторов (M0); В - клетка Купфера, поляризованная по M1-фенотипу; Г - макрофаг костномозгового происхождения, поляризованный по M1-фенотипу; Д - клетка Купфера, поляризованная по M2-фенотипу; Е - макрофаг костномозгового происхождения, поляризованный по M2-фенотипу.

По данным электронно-микроскопического исследования макрофагов, фагоцитировавших латексные частицы, заметных изменений морфологии фагоцитирующих клеток по сравнению с неактивированными клетками не было установлено.

Таким образом, при изучении фагоцитарной активности был обнаружен ряд особенностей клеток Купфера по сравнению с макрофагами костномозгового происхождения. Для макрофагов костномозгового и эмбрионального происхождения характерна следующая динамика фагоцитарной активности: для клеток Купфера - резкое колебание фагоцитарной активности и быстрое нарастание; костномозгового макрофаги изначально обладают более выраженной фагоцитарной активностью, которая постепенно нарастает по ходу эксперимента. При этом после активации M1 и M2 индукторами макрофаги костномозгового происхождения более длительное время сохраняли способность к фагоцитозу по сравнению с клетками Купфера. Фагоцитоз как в клетках Купфера, так и костномозговых макрофагах на качественном уровне протекает с формированием полноценных зрелых эндосом с кислой средой. На ультраструктурном уровне заметных изменений морфологии фагоцитирующих клеток по сравнению с клетками, находящимися в покое, отмечено не было.

4.15. Изучение пролиферативной активности методом иммуноцитохимии

Способность макрофагов к пролиферации оценивали методом иммуноцитохимического окрашивания по экспрессии маркера пролиферации Ki67. При флуоресцентной микроскопии (увеличение $\times 400$) подсчитывали общее количество клеток и количество клеток, положительно окрашенных соответствующим антителом.

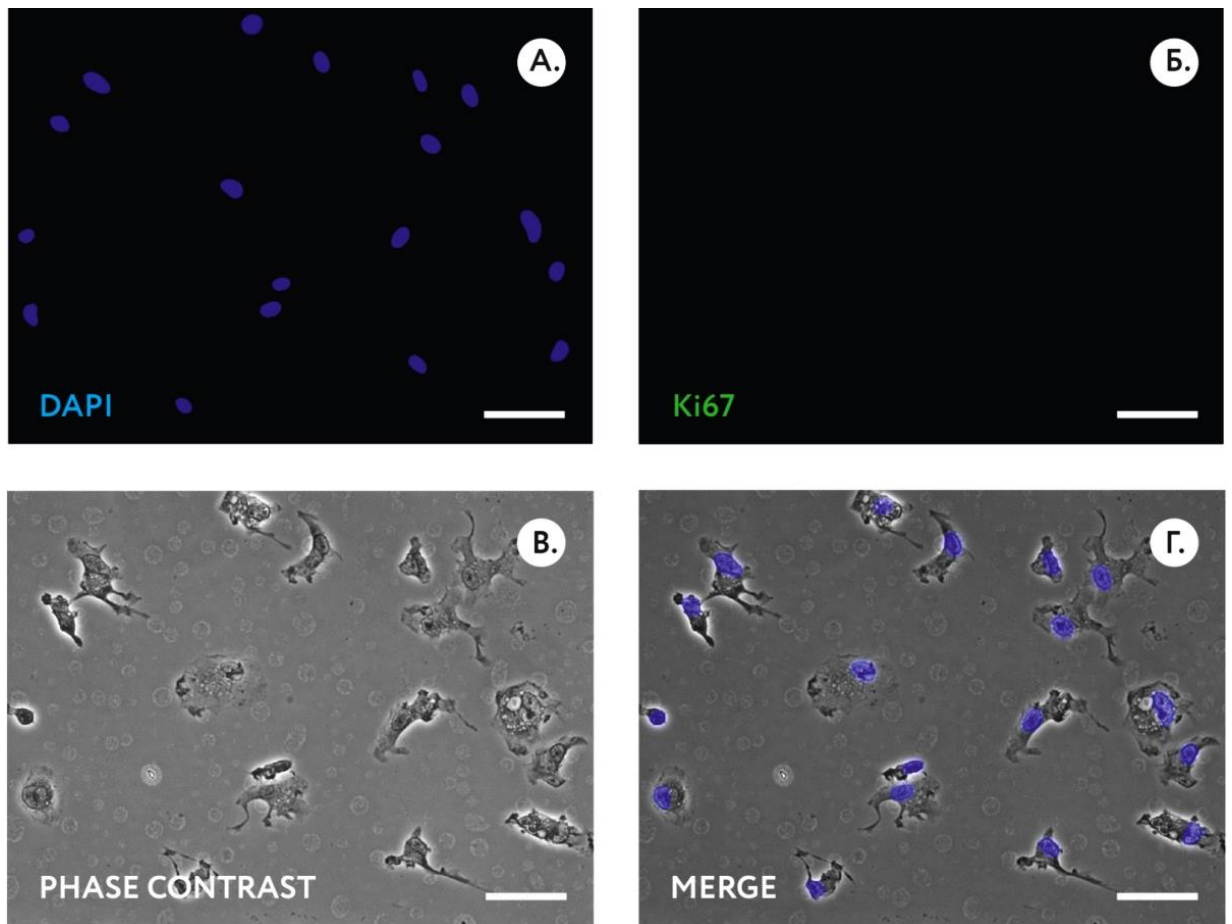


Рисунок 41. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в клетках Купфера, поляризованных M1-фенотипу, флуоресцентная микроскопия, Ki67 – (FITC) – положительно окрашенные клетки отсутствуют, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм.

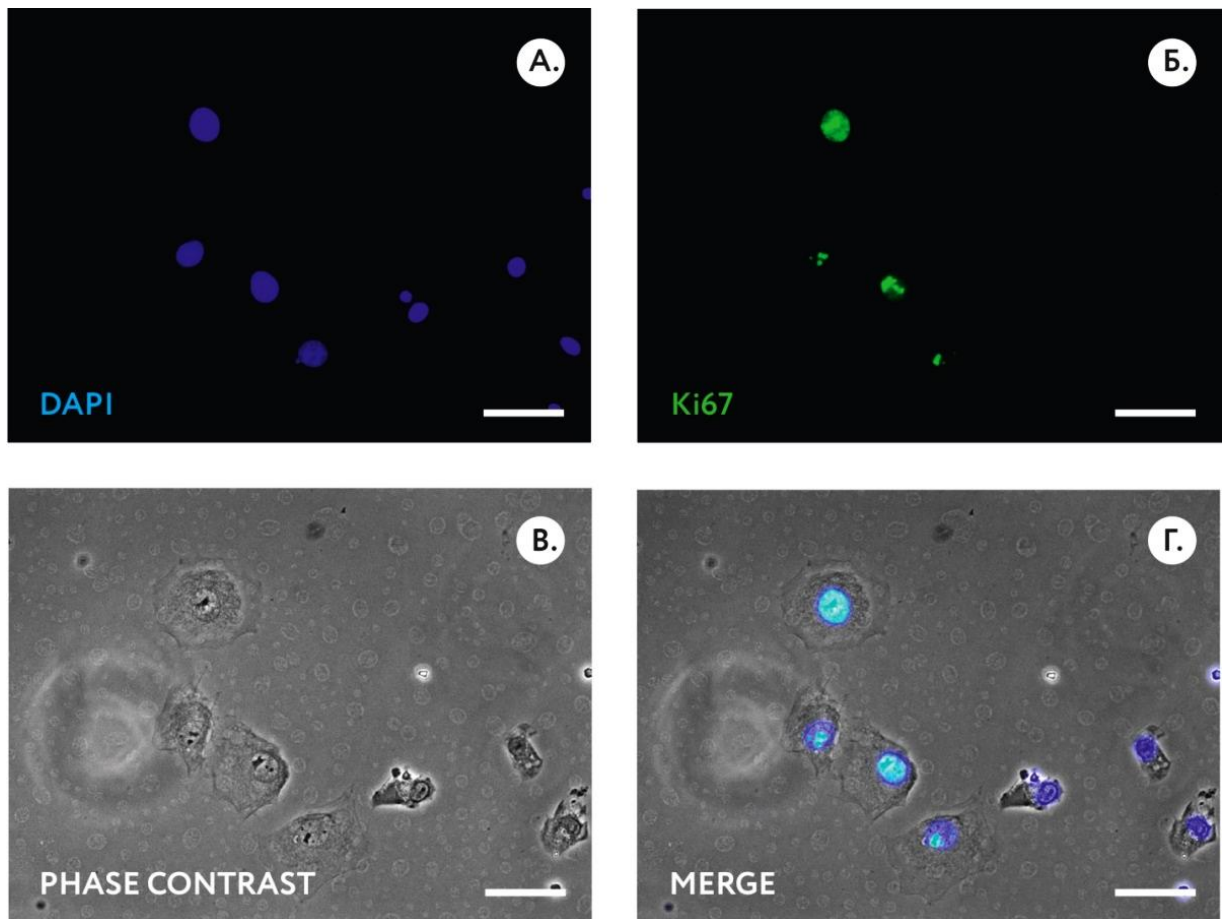


Рисунок 42. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в клетках Купфера, поляризованных M2-фенотипу, флуоресцентная микроскопия, Ki67 – зеленое свечение (FITC), докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм.

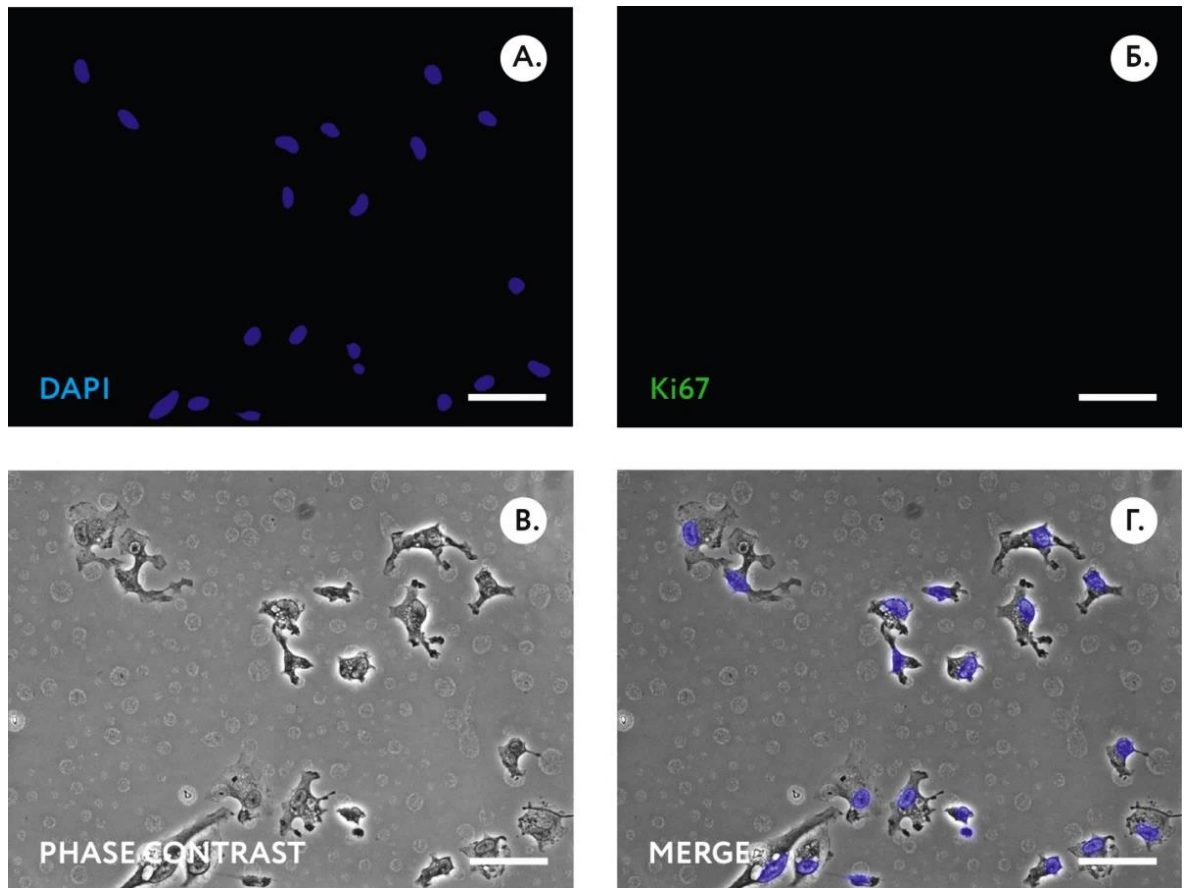


Рисунок 43. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в макрофагах костномозгового происхождения, активированных по M1-фенотипу, флуоресцентная микроскопия, Ki67 – (FITC) – положительно окрашенные клетки отсутствуют, докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм.

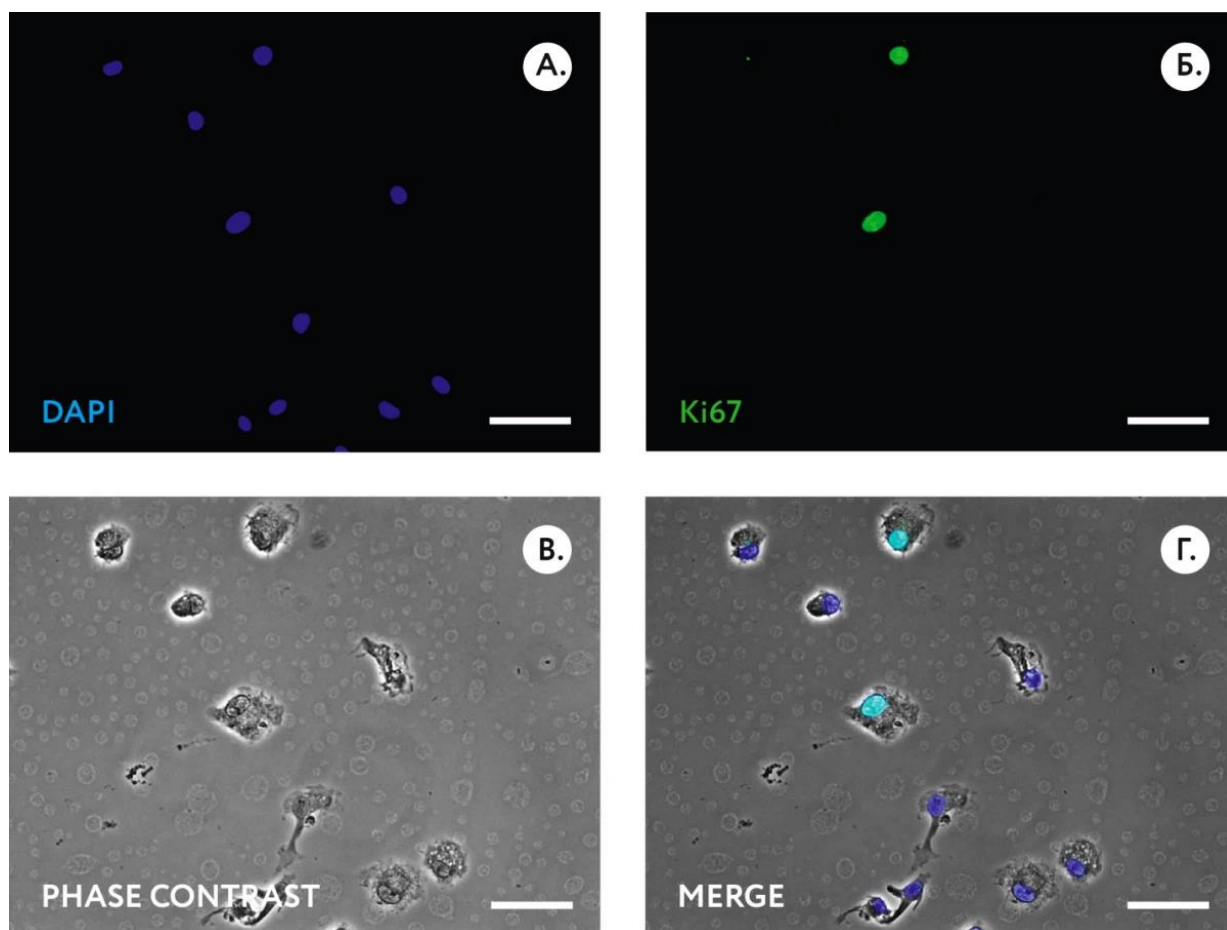


Рисунок 44. Экспрессия маркера пролиферации Ki67 в макрофагах костномозгового происхождения, активированных по M2-фенотипу, флуоресцентная микроскопия, Ki67 – зеленое свечение (FITC), докраска ядер DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм.

Способность эмбриональных и костномозговых макрофагов к пролиферации оценивали через 24 часа после внесения в культуры факторов, активирующих M1 и M2 фенотип.

Клеток, положительных по маркеру пролиферации Ki67, в культурах резидентных макрофагов печени, активированных по M1 фенотипу выявлено не было (Рисунок 41). В культурах костномозговых макрофагов, активированных по M1 фенотипу, пролиферирующие клетки также отсутствовали (Рисунок 43).

Таким образом, было показано, что пролиферирующие клетки Купфера и макрофаги костномозгового происхождения наблюдаются только в условия

воздействия M2-факторов поляризации, которые включают макрофагальный колониестимулирующий фактор M-CSF и ИЛ-4 (Рисунки 42, 44).

Полученные результаты сравнения иммунофенотипических, морфологических и функциональных свойств интактных и активированных по M1 и M2 фенотипу резидентных макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения обобщены в таблице (Таблица 6).

Таблица 6. Результаты сравнения интактных и активированных по M1 и M2 фенотипу макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения

Изучаемая характеристика	Макрофаги эмбрионального происхождения	Макрофаги костномозгового происхождения
	Неактивированные M0	
Иммунофенотип	CD68 ⁺ CD163 ⁺ CD11b ⁻ CD86 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁺	CD68 ⁺ CD163 ⁺ CD11b ⁺ CD86 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁺
Форма	полигональная, треугольная, веретеновидная	округлая
Экспрессия генов	IL1 β $\uparrow$ IL10 $\uparrow$ Arg $\uparrow$	IL13 $\uparrow$ IL18 $\uparrow$
Секреция белков	TNF α , IL6, IL10	TNF α , IL1 β , IL6, IL10
Фагоцитоз	1 час: $\uparrow$ 2 часа: $\approx$ 5 часов: $\uparrow$ 24 часа: $\approx$	1 час: $\downarrow$ 2 часа: $\approx$ 5 часов: $\downarrow$ 24 часа: $\approx$
Пролиферация	отсутствует	отсутствует

	Активированные по M1 фенотипу	
Иммунофенотип	CD68 ⁺ CD11bCD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁻	CD68 ⁺ CD11b ⁺ CD163 ⁺ CD86 ⁺ CD206 ⁺ iNOs ⁺ Arg1 ⁻
Форма	незначительные изменения: клетки становились более отростчатыми	незначительные изменения: клетки становились более отростчатыми
Экспрессия генов	IL1 β $\uparrow$ IL4 $\uparrow\uparrow$ IL6 $\uparrow$ IL10 $\uparrow\uparrow$ IL13 $\uparrow\uparrow$ TNF α $\uparrow$ Arg $\uparrow$	IL1 β $\uparrow\uparrow$ IL6 $\uparrow$ IL18 $\uparrow$ TNF α $\uparrow\uparrow$ iNOs $\uparrow\uparrow$
Секреция белков	Il1 β $\uparrow$ 3сутки	Il6 $\uparrow$ 1 сутки Il10 $\uparrow$ 1 сутки
Фагоцитоз	$\uparrow\uparrow$ в сравнении с M0	$\uparrow\uparrow$ 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 $\uparrow$ IL10 $\uparrow$ IL18 $\uparrow$	IL1 β $\uparrow$ IL12 $\uparrow$ TNF α $\uparrow$

		Arg1 ↓
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

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Макрофагам отводится значительная роль в регуляции репаративных процессов, а также в развитии патологических состояний различных органов, в том числе печени [Bilzer, Roggel, Gerbes, 2006; Li и др., 2017].

В настоящее время сформировалась M1/M2-концепция, которая отражает представления о функциональной пластичности макрофагов. Считается, что M1-макрофаги выделяют провоспалительные цитокины и регулируют репаративные процессы на раннем этапе, а противовоспалительные M2-макрофаги регулируют финальные стадии репарации. Однако в последнее время все чаще появляются сообщения о существовании континуума фенотипов активированных макрофагов, где M1 и M2-макрофаги являются крайними вариантами. Даже в условиях *in vitro* при воздействии специфических индукторов невозможно получить гомогенную популяцию M1 или M2 макрофагов, поскольку клетки взаимодействуют с ксеногенными белками культуральной среды и полимерным материалом подложки [Jablonski и др., 2015]. Для каждого из функциональных классов макрофагов (провоспалительные (M1) и противовоспалительные (M2) характерен определенный набор поверхностных маркеров и профиль секретируемых цитокинов. Известно, что M1-фенотип макрофагов формируется под влиянием LPS и IFN-γ. Для него характерна экспрессия поверхностного маркера CD86 и провоспалительных цитокинов (IL1β, IL6, TNFα). M2-фенотип макрофагов формируется в ответ на воздействие IL4 и IL10, после чего у макрофагов

активируется экспрессия CD163, CD206, а также синтез IL 10 [Martinez, Gordon, 2014a].

Вероятно, источник происхождения макрофагов также влияет на особенности активации и функционирования данных клеток как в условиях физиологической нормы, так и при патологических состояниях [Chazaud, 2014; Erelman, Lavine, Randolph, 2014]. В настоящей работе была поставлена цель провести сравнительную оценку морфофункциональных свойств макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения. Такой сравнительный анализ был проведен на примере клеток Купфера (эмбриональные макрофаги) и производных моноцитов крови (костномозговые макрофаги).

Для получения первичных культур макрофагов эмбрионального происхождения использовали ранее описанные методики и протоколы W.Q. Zeng и Q. Zhang с соавторами в незначительной модификации [Zeng и др., 2013; Zhang и др., 2016]. Получение костномозговых макрофагов проводили с использованием общепринятой методики фракционного центрифугирования, основанной на седиментации клеток в одноступенчатом градиенте плотности растворов высокомолекулярных сополимеров полисахарозы. Методика разделения периферической крови на популяции, основанная на фракционировании клеток по их физическим свойствам: гранулярности, размерам и заряду, была разработана и предложена А. Воуит в 1968 году и применяется по настоящее время в различных модификациях, в зависимости от типа клеток интереса, биологического вида – источника клеток и целей эксперимента [Böyum, 1968]. Методика основана на различной способности к седиментации у клеточных популяция крови в условиях растворов, создающих градиент изотоничности и плотности. Помимо этого, растворы высокомолекулярных сополимеров полисахарозы выступают в качестве агентов, агрегирующих эритроциты, что обеспечивает более эффективное и «чистое» разделение.

Селективная адгезия клеток к поверхности культурального пластика или стекла является одним из инструментов селективного изолирования популяций макрофагов из смешанных культур или гомогенатов тканей [Alpini и др., 1994].

Клетки Купфера начинают адгезироваться к культуральной поверхности уже спустя 30 минут после помещения их в культуральную емкость со средой [Cai, Kaphalia, Ansari, 2005]. Многочисленные модификации способов выделения клеток Купфера из смешанных первичных культур клеток печени [Braet и др., 1994; Kitani и др., 2010; Li и др., 2014; Meyer и др., 2016] основываются на классическом методе выделения резидентных макрофагов печени, описанном в 1985 году [Smedsrod, Pertoft, 1985], согласно которому чистота выделенной популяции по маркеру CD68 составляет 90-95%, что согласуется с данными, полученными в настоящем эксперименте.

Использование синтетических высокомолекулярных сополимеров полисахарозы (коммерческие названия – Фиколл, Lympholyte, Histopaque, Percoll) в чистом виде, а также с добавлением рентгеноконтрастных веществ (верографин, изопак, урографин, др.) для градиентного выделения макрофагов и их последующего изучения является широко используемой методикой [Grau и др., 2000; Muschter и др., 2015; Zeng и др., 2013]. Хорошо известно, что используемые для градиентного центрифугирования вещества могут оказывать неблагоприятное токсическое влияние на клетки, выделяемые с их использованием. Благодаря использованию протокола, включающего на стадии селективного культивирования этап преддифференцировки, заключающийся в культивировании клеток в среде с факторами M-CSF и GM-CSF в течение нескольких дней, удалось уменьшить отрицательное воздействие синтетических высокомолекулярных сополимеров полисахарозы и получить более стабильные фенотипы макрофагов, а также в некоторой степени нивелировать условия микроокружения, в котором находились клетки до их выделения, и подчеркнуть разницу между макрофагами, связанную с источником их происхождения [Mia и др., 2014; Vogel и др., 2014].

Макрофаги представляют собой дифференцированные и высокоспециализированные клетки. В связи с этим для получения фенотипически более устойчивых популяций макрофагов, выделенные моноциты и клетки Купфера культивировали в среде, содержащей M-CSF или GM-CSF, в течение нескольких дней перед индукцией в направлении M1- или M2- фенотипа. В таких

условиях моноциты реагировали на индуцирующие факторы как единая популяция [Italiani, Boraschi, 2014b].

Полученные вышеописанными методами первичные культуры макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера содержали примерно одинаковое количество клеток, около 90%, положительных по маркеру CD68, который в литературе описан как специфический пан-макрофагальный маркер млекопитающих [Behnke и др., 2018; Halдар, Murphy, 2014; Movita и др., 2012; Zigmond и др., 2014]. Эти данные свидетельствуют в первую очередь о том, что выделенные популяции клеток являются макрофагами. Во-вторых, почти стопроцентная экспрессия трансмембранного гликопротеида CD68 свидетельствует о высокой чистоте и гомогенности выделенных в первичную культуру клеток и подтверждает адекватность выбранной методики селективного изолирования и культивирования.

Более 90% макрофагов костномозгового происхождения имели на своей поверхности интегрин CD11b, в то время как положительные по маркеру CD11b клетки Купфера составляли около 7% от всей выделенной популяции макрофагов, полученных из печени. По литературным данным, макрофаги, выделенные в первичную культуру из костного мозга, экспрессируют маркер CD11b на высоком уровне [Halдар, Murphy, 2014; Hoeffel, Ginhoux, 2018; Movita и др., 2012; Perdiguero, Geissmann, 2016; Zigmond и др., 2014], поэтому CD11b чаще всего используют в качестве маркера макрофагов костномозгового происхождения. Согласно литературным данным, доля макрофагов печени, положительных по поверхностному маркеру CD11b, колеблется от 5 до 30% [Kinoshita и др., 2010; Nishiyama и др., 2015]. При этом есть сообщения, что резидентные макрофаги центральной нервной системы, происходящие из гемопоэтических клеток желточного мешка, также экспрессируют CD11b [Epelman, Lavine, Randolph, 2014]. Это подтверждает, что вышеописанные полученные культуры являются резидентными макрофагами печени – клетками Купфера с фенотипом $CD68^+CD11b^-$ и макрофагами моноцитарного происхождения - $CD68^+CD11b^+$.

Было установлено, что макрофаги моноцитарного происхождения и клетки Купфера, выделенные в первичную культуру, экспрессировали маркеры CD86, CD206 и CD163, но с разной степенью выраженности. У интактных костномозговых макрофагов преобладала экспрессия как маркера M1-фенотипа – CD86, так и M2-маркера – CD163 по сравнению с эмбриональными макрофагами. Маркер M2 поляризации CD206 экспрессировался на высоком уровне в обоих типах первичных культур, но в клетках Купфера статистически значимо выше чем в костномозговых макрофагах. Высокий уровень экспрессии индуцируемой NO-синтазы (iNOs) и аргиназы Arg1 также был отмечен как в костномозговых клетках, так и в клетках Купфера.

При изучении динамики изменения фенотипа макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера было показано, что оба вида макрофагов реагируют на факторы, индуцирующие M1 и M2 поляризацию.

При активации клеток Купфера по M1 фенотипу экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD206 и CD86 достоверно не изменилась. Экспрессия маркера M1 макрофагов - iNOs статистически значимо повысилась. Экспрессия маркеров M2 макрофагов (Arg1, CD163) статистически значимо понизилась по сравнению с M0 клетками. Таким образом, фенотип клеток Купфера, активированных по M1-фенотипу, был $CD68^+CD11b^-CD163^+CD86^+CD206^+iNOs^+Arg1^-$.

При активации клеток Купфера по M2 фенотипу экспрессия маркеров CD68, CD11b, CD206, CD163 и CD86 достоверно не изменилась. Экспрессия маркера M1 макрофагов iNOs статистически значимо снизилась, экспрессия маркера M2 макрофагов Arg1 достоверно повысилась. Фенотип клеток Купфера, активированных по M2-фенотипу, был $CD68^+CD11b^-CD163^+CD86^+CD206^+iNOs^-Arg1^+$.

В макрофагах костномозгового происхождения активация по M1 фенотипу привела к достоверному снижению экспрессии маркеров M2 макрофагов Arg1 и CD163. Количество клеток, экспрессирующих маркер M1 макрофагов iNOs статистически значимо не изменилось. На маркеры CD68, CD11b и CD206 активация по M1 пути также достоверно не повлияла. Экспрессия маркера CD86

достоверно снизилась в сравнении с M0 культурами. Таким образом, иммунофенотип костномозговых макрофагов, активированных по M1-фенотипу, был определен как $CD68^+CD11b^+CD163^+CD86^+CD206^+iNOs^+Arg1^-$.

Под влиянием факторов M2 среды в костномозговых макрофагах экспрессия CD68, CD11b, CD206, CD163 и CD86 достоверно не изменилась. Экспрессия маркера M1 макрофагов iNOs статистически значимо снизилась, экспрессия маркера M2 макрофагов Arg1 достоверно повысилась в сравнении с M0 культурами. Фенотип костномозговых макрофагов, активированных по M2-фенотипу, был определен как $CD68^+CD11b^+CD163^+CD86^+CD206^+iNOs^-Arg1^+$.

Динамика изменения иммунофенотипов интактных и поляризованных макрофагов костномозгового происхождения и клеток Купфера представлена на Рисунке 45.

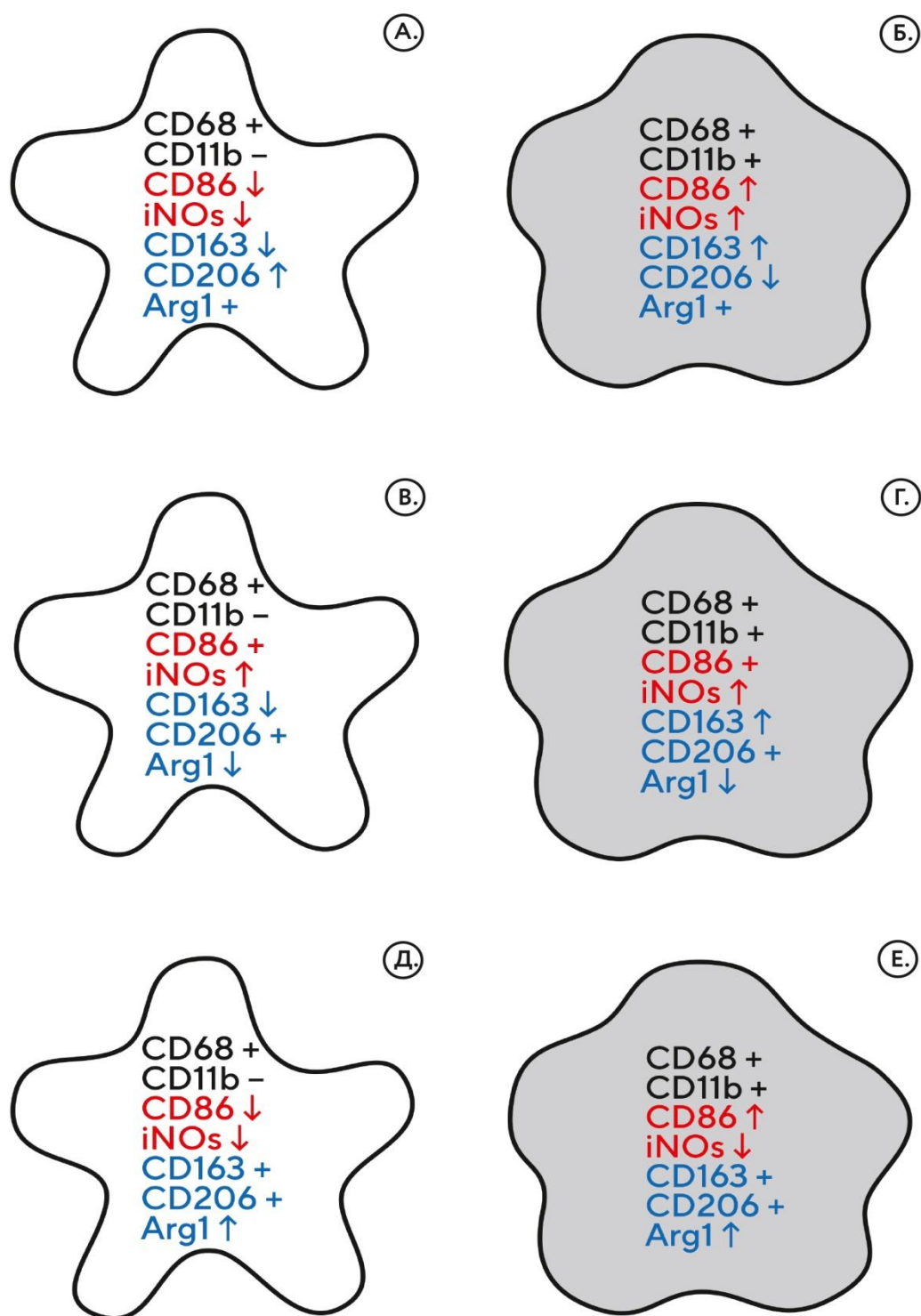


Рисунок 45. Иммунофенотипы intactных и поляризованных макрофагов. А – н клетки Купфера; Б – intactные макрофаги костномозгового происхождения; В – клетки Купфера, активированные по M1-фенотипу; Г - макрофаги костномозгового происхождения, активированные по M1-фенотипу; Д - клетки Купфера, активированные по M2-фенотипу; Е - макрофаги костномозгового происхождения, активированные по M2-фенотипу.

Факторы активации M1 и M2 фенотипа не влияли на экспрессию маркеров CD68 и CD11b как в клетках Купфера, так и в макрофагах костномозгового происхождения. Экспрессия пан-макрофагальных маркеров (CD68 – для эмбриональных макрофагов, CD68 и CD11b – для костномозговых) оставалась достоверно высокой как в условиях провоспалительных, так и противовоспалительных факторов активации, что подтверждает мнение о маркерах CD68 и CD11b, как о пан-маркерах клеток макрофагальной природы, не характеризующими функциональное состояние клеток и не зависящими от условий микроокружения и факторов активации [Bale и др., 2016; Shapouri-Moghaddam и др., 2018; Zhang и др., 2016].

При воздействии факторов M1-фенотипа макрофаги костномозгового происхождения экспрессируют индуцируемую NO-синтазу на том же уровне, что и в неактивированной культуре M0. Добавление в культуральную среду факторов активаторов M2-фенотипа привело к резкому статистически достоверному снижению количества клеток, экспрессирующих NO-синтазу, как в культурах клеток Купфера, так и в макрофагах костномозгового происхождения. Добавление факторов, индуцирующих поляризацию, влияло и на экспрессию аргиназы Arg1 в обоих типах макрофагов. Добавление в культуральную среду факторов активаторов классического M1-фенотипа привело к резкому статистически достоверному снижению количества клеток, экспрессирующих аргиназу, как в культурах клеток Купфера, так и в макрофагах костномозгового происхождения.

Индуцируемую NO-синтазу и аргиназу относят к наиболее релевантным и информативным маркерам функциональных состояний макрофагов. Повышенная экспрессия iNOs характерна для активированного M1 фенотипа макрофагов, в то время как Arg1 начинает экспрессироваться на высоком уровне при воздействии факторов M2 поляризации [Dulus 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].

Таким образом, несмотря на соотнесение таких поверхностных маркеров как CD86, CD206 и CD163 с каким-то определенным функциональным типом макрофагов (M1 или M2), увеличение экспрессии указанных белков в этом исследовании происходило у обоих типов макрофагов как под влиянием сочетания LPS и IFN- γ для активации M1 фенотипа, так и IL4, IL10 и IL13 для фенотипа M2. И только маркеры iNOs и Arg1 показали свою высокую специфичность и корреляцию в отношении M1/M2 поляризационного континуума макрофагов, вне зависимости от источника их происхождения. Эти маркеры проявили себя как наиболее специфичные и чувствительные к соответствующим факторам активации.

Сходные результаты получены и при исследовании экспрессии генов цитокинов. Отмечено, что у макрофагов разного происхождения одновременно активировалась экспрессия генов провоспалительных (*IL1 β* , *IL6*, *TNF α*), и противовоспалительных (*IL10*) цитокинов как под влиянием LPS и IFN- γ , так и при воздействии IL4, IL10 и IL13.

Исходя из этого, невозможно провести четкую границу между макрофагами с M1 и M2-фенотипом. Между про и противовоспалительными макрофагами существует непрерывный ряд переходных форм, которые формируются в соответствии с конкретным микроокружением в тканях [Jablonski и др., 2015].

По мнению некоторых авторов, причиной существования нескольких популяций макрофагов разного происхождения в организме млекопитающих является разная чувствительность моноцитарных и эмбриональных резидентных макрофагов к факторам микроокружения. Показано, что резидентные макрофаги эмбрионального происхождения [Epelman, Lavine, Randolph, 2014] обладают большей чувствительностью к макрофагальному колониестимулирующему фактору по сравнению с макрофагами костномозгового происхождения [Guilliams, Scott, 2017]. Нами также получены данные, согласно которым макрофаги из разных генераций обладают разной чувствительностью к факторам активации. Показано, что оба типа макрофагов более чувствительны к

воздействию LPS, чем к IL4 и IL10, но макрофаги костномозгового происхождения более чувствительными к воздействию LPS.

В основе чувствительности клеток Купфера к LPS лежит состояние LPS-толерантности, которое развивается при повторном воздействии эндотоксина, оно выражается отсутствием индукции синтеза провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL6, TNF α) и увеличением продукции противовоспалительного цитокина IL10 [Liu и др., 2019; West, Heagy, 2002]. LPS-толерантность у резидентных макрофагов печени развивается в следствии того, что на клетки постоянно воздействуют эндогенные токсины, образующиеся в кишечнике, которые с кровотоком попадают в печень [Michalopoulos, 2014]. В исследованиях *in vitro* показано, что развитие LPS-толерантности у макрофагов также может выражающейся в отсутствии экспрессии LPS-зависимых генов [West, Heagy, 2002].

Макрофаги эмбрионального и костномозгового происхождения, обладают разной чувствительностью к факторам активации. На модели токсического поражения печени показано, что высокая доза LPS вызывает снижение экспрессии гена CD163 в резидентных макрофагах и не влияет на мигрирующие в печень макрофаги костномозгового происхождения [Beattie и др., 2016].

Показано, что экспрессия маркера M1 макрофагов CD86, участвующего в активации и дифференцировке Т-лимфоцитов [Chen, Flies, 2013], и трансмембранного белка-регулятор острой фазы CD163, опосредующего эндоцитоз гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов, маркера M2 макрофагов [Fabriek и др., 2009], в макрофагах эмбрионального происхождения практически не изменялись. В макрофагах костномозгового происхождения было отмечено достоверное изменение экспрессии этих маркеров. При этом оказалось то, что уровень экспрессии маркера M1 макрофагов CD86 при воздействии факторов M1-поляризации был меньше, чем под влиянием факторов активации по M2-пути, а экспрессия маркера M2 макрофагов CD163 снижалась при воздействии как M1, так и M2 индуцирующих сред.

Разная чувствительность к факторам активации характерна не только для поверхностных и внутриклеточных маркеров, но и для ряда генов цитокинов. Результаты, полученные в ходе оценки экспрессии генов показали, что независимо от действия M1 или M2 поляризующих сред в макрофагах костномозгового происхождения быстрее и продолжительнее повышается экспрессия генов провоспалительных цитокинов - *IL1 β* , *IL12a*, *TNF α* , а в макрофагах эмбрионального происхождения - противовоспалительных – *IL4* и *IL10*, *IL13*. При этом в неактивированных макрофагах – производных моноцитов уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL6* и *IL12a* был статистически значимо выше, чем в клетках Купфера.

Продemonстрировано, что для макрофагов разных генераций характерен неодинаковый паттерн экспрессии M1- и M2- ассоциированных генов. Также следует отметить, что макрофаги моноцитарного происхождения отвечали на воздействие индуцирующих сред быстрее, чем клетки Купфера.

Установлено, что более позднее, по сравнению с макрофагами костномозгового происхождения, начало экспрессии генов провоспалительных цитокинов, в частности *TNF α* , после поляризации в культуре клеток Купфера, является признаком LPS-толерантности тканевых резидентных макрофагов печени. [Elchaninov и др., 2016; Elchaninov и др., 2018].

Таким образом, результаты изучения экспрессии генов подтвердили гипотезу о существовании фенотипического и функционального континуума (спектра) макрофагов, крайними точками которого являются «идеальные» M1 и M2 макрофаги. Полученные результаты показали, что макрофаги костномозгового происхождения быстрее реагируют на факторы активации, изменяя фенотип в провоспалительном направлении, в то время как макрофаги эмбрионального происхождения коммитированы в противовоспалительном направлении. (Рисунок 46).

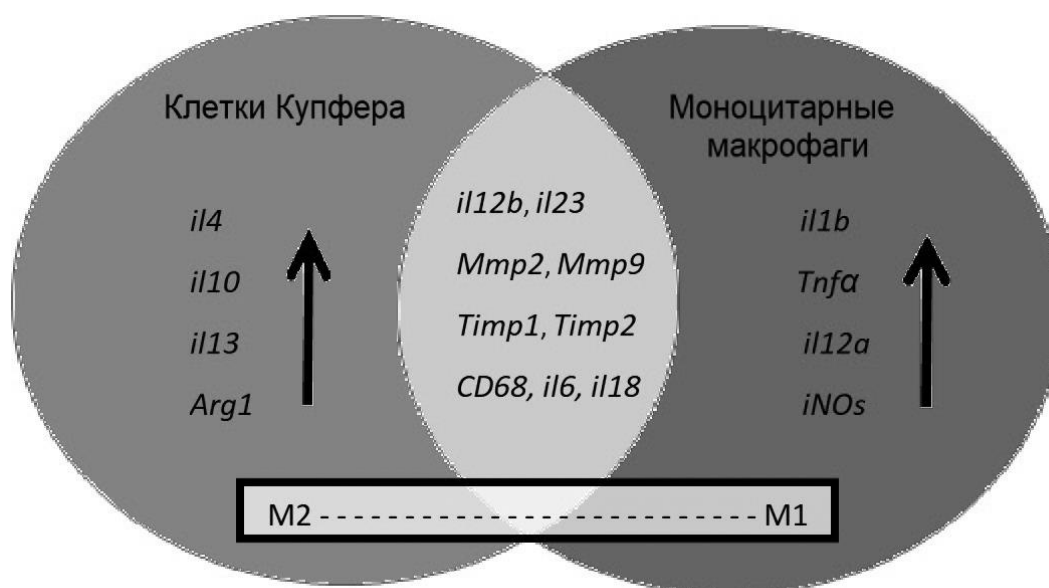


Рисунок 46. Схема экспрессии генов цитокинов в клетках Купфера и макрофагах костномозгового (моноцитарного) происхождения.

Различия между клетками Купфера и макрофагами костномозгового происхождения касались не только экспрессии генов цитокинов. Полученные данные также свидетельствуют и о разной динамике фагоцитарной активности у макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения. Для неактивированных M0 костномозговых макрофагов характерна стабильная активность фагоцитоза, в то время как у клеток Купфера обнаружен резкий всплеск фагоцитарной активности в первые часы эксперимента, а затем ее резкое ослабление. После добавления M1 или M2 поляризующих факторов фагоцитарная активность усиливалась как у клеток Купфера так и у макрофагов костномозгового происхождения.

Следует отметить, что в течение первого часа эксперимента неактивированные макрофаги костномозгового происхождения демонстрировали более выраженную фагоцитарную активность по сравнению с клетками Купфера. Подобные данные ранее были получены в эксперименте по влиянию ионизирующего облучения на популяции клеток печени. В работе Beattie и соавторов было продемонстрировано, что макрофаги – производные моноцитов крови, которые мигрируют в печень после травмы, также обладают более

выраженной фагоцитарной активностью по сравнению резидентными макрофагами [Beattie и др., 2016].

Фагоцитарная активность и презентация антигенов - ключевые функции макрофагов. Различия между макрофагами костномозгового и эмбрионального происхождения по этим характеристикам, вероятно, обосновывают распределение этих клеток в организме. Показано, что в органах, испытывающих наибольшую антигенную нагрузку (например, кожа и кишечник) присутствуют преимущественно макрофаги костномозгового происхождения, а основной функцией резидентных макрофагов эмбрионального происхождения является регуляция клеточного гомеостаза. [Chazaud, 2014; Gomez Perdiguero и др., 2015a; Perdiguero, Geissmann, 2016].

В настоящее время в литературе нет единой точки зрения о пролиферативном потенциале макрофагов из разных источников происхождения (эмбрионального и костномозгового) и различного функционального статуса (неактивированные или поляризованные по M1 или M2 фенотипу). Согласно данным Jenkins SJ и соавторов, макрофаги костномозгового происхождения утратили способность к пролиферативному делению в отличие от макрофагов эмбрионального происхождения [Jenkins и др., 2011; Zigmond и др., 2014]. Эксперимент по оценке пролиферативного потенциала макрофагов двух генераций методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител к маркеру пролиферации Ki67 показал, что пролиферация макрофагов как костномозгового так и эмбрионального происхождения происходит только при воздействии факторов поляризации по провоспалительному M2 фенотипу, в состав которых входят колониестимулирующий фактор макрофагов и ИЛ-4. Данная специфика пролиферативной способности тканевых резидентных макрофагов печени обосновывает тот факт, что при токсическом повреждении популяция клеток Купфера восстанавливается за счет макрофагов костномозгового происхождения мигрирующих в орган. Можно предположить, что клетки Купфера утратили способность к митотическому делению в связи с отсутствием

печени П4, что было продемонстрировано на модели токсического повреждения печени [Zigmond и др., 2014].

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.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы было проведение комплексного сравнительного исследования клеток Купфера и макрофагов костномозгового происхождения. Рабочей гипотезой данного исследования было предположение о том, что макрофаги разного происхождения отличаются по морфофункциональным 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 наших представлений о морфофункциональных 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 M1 макрофагов или противовоспалительных M2 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*, *IL12α*, *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 СОКРАЩЕНИЙ

- ГКИТ - гигантские клетки инородных тел
- ЛПС (LPS) – липополисахарид
- МСК - мультипотентные стромальные клетки
- НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РИТ - реакция на инородное тело
- IL-1a - интерлейкин 1a
- IL-1b – интерлейкин 1b
- IL-4 – интерлейкин 4
- IL-6 – интерлейкин 6
- IL-10 – интерлейкин 10
- IL-12 – интерлейкин 12
- IL-13 – интерлейкин 13
- IL-18 – интерлейкин18
- IL-23 – интерлейкин 23
- IL-27 – интерлейкин 27
- IL-33 – интерлейкин 33
- TGFb - трансформирующий фактор роста бета
- TNF α - фактор некроза опухолей альфа
- iNOs – индуцированная NO синтетаза
- M-CSF - колониестимулирующий фактор макрофагов
- GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- COX-2 – циклооксигеназа-2
- IFN- γ - интерферон-гамма
- Th1 - Т-хелперы 1, Т-хелперные лимфоциты 1 типа
- Th2 - Т-хелперы 2, Т-хелперные лимфоциты 2 типа
- Th17 - Т-хелперы 17, Т-хелперные лимфоциты 17 типа

Arg1 – аргиназа 1

TLR - толл-подобные рецепторы

MMP-2 - матричная металлопротеиназа-2

MMP-9 - матричная металлопротеиназа-9

MMP-10 - матричная металлопротеиназа-10

MMP-12 - матричная металлопротеиназа-12

EGFR - рецептор эпидермального фактора роста

PDGF - фактор роста тромбоцитов

FGF - фактор роста фибробластов

HGF - фактор роста гепатоцитов

NF-κB - транскрипционный ядерный фактор «каппа-би»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahuja V., Miller S.E., Howell D.N. Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43 // *Cell. Immunol.* 1995.
2. Alpini G. и др. Recent advances in the isolation of liver cells // *Hepatology.* 1994. Т. 20. № 2. С. 494–514.
3. Armbrust T., Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver // *J. Hepatol.* 1996.
4. Arutyunyan I. и др. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015.
5. Austyn J.M., Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage // *Eur. J. Immunol.* 1981. Т. 11. № 10. С. 805–815.
6. Baeck C. и др. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury // *Gut.* 2012. Т. 61. № 3. С. 416–426.
7. Bagratashvili V.N. и др. Supercritical fluid fabrication of components for a sustained-release injectable risperidone dose form // *Russ. J. Phys. Chem. B.* 2016.
8. Bain C.C. и др. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C^{hi} monocyte precursors // *Mucosal Immunol.* 2013.
9. Bale S.S. и др. Isolation and co-culture of rat parenchymal and non-parenchymal liver cells to evaluate cellular interactions and response // *Sci. Rep.* 2016.
10. Barnett-Vanes A. и др. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: Validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation // *PLoS One.* 2016. Т. 11. № 1.
11. Bashir S. и др. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases // *Inflamm. Res.* 2016.
12. Beattie L. и др. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display

unique transcriptomic signatures but similar biological functions // J. Hepatol. 2016. T. 65. № 4. С. 758–768.

13. Behnke K. и др. B Cell-Mediated Maintenance of Cluster of Differentiation 169–Positive Cells Is Critical for Liver Regeneration // Hepatology. 2018.

14. Belgiovine C. и др. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links // Cell. Mol. Life Sci. 2016.

15. Beschin A., Baetselier P. De, Ginderachter J.A. Van. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection // J. Pathol. 2013.

16. Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease // Liver Int. 2006.

17. Biswas S.K. и др. Macrophage polarization and plasticity in health and disease // Immunol. Res. 2012.

18. Biswas S.K., Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages // Cell Metab. 2012.

19. Blériot C. и др. Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection // Immunity. 2015. T. 42. № 1. С. 145–158.

20. Böyum A. Isolation and removal of lymphocytes from bone marrow of rats and guinea-pigs. // Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl. 1968.

21. Braet F. и др. Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells // Lab. Investig. 1994.

22. Braga T.T., Agudelo J.S.H., Camara N.O.S. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe // Front. Immunol. 2015.

23. Brodbeck W.G. и др. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells // J. Biomed. Mater. Res. 2001.

24. Brown B.N. и др. Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine // Biomaterials. 2012.

25. Cai P., Kaphalia B.S., Ansari G.A.S. Methyl palmitate: Inhibitor of phagocytosis in primary rat Kupffer cells // Toxicology. 2005. T. 210. № 2–3. С. 197–204.

26. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease // *ScientificWorldJournal*. 2011.
27. Cassol E. и др. Macrophage polarization and HIV-1 infection // *J. Leukoc. Biol.* 2010.
28. Cavaillon J.-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff // *J. Leukoc. Biol.* 2011.
29. Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration // *Immunobiology*. 2014.
30. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* 2013.
31. Chen L.W.W.P.H.W.S.M.S.Y.H.Y.P.L.J.L.Y. Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus C+ Monocytes and Kupffer Cells Orchestrate Liver Immune Responses Against Hepatitis B Virus in Mice - Wu - 2019 - *Hepatology* - Wiley Online Library // *Hepatology*. 2019. T. 69. № 6. С. 2364–2380.
32. Chistiakov D.A. и др. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes // *Int. J. Cardiol.* 2015.
33. Chua C.L.L. и др. Monocytes and macrophages in malaria: Protection or pathology? // *Trends Parasitol.* 2013. T. 29. № 1. С. 26–34.
34. Coffman R.L. Origins of the TH1-TH2 model: A personal perspective // *Nat. Immunol.* 2006. T. 7. № 6. С. 539–541.
35. Cooper M.D., Alder M.N. The evolution of adaptive immune systems // *Cell*. 2006.
36. Curren Smith E.W. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2015.
37. Das A. и др. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration // *Am. J. Pathol.* 2015.
38. David B.A. и др. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice // *Gastroenterology*. 2016. T. 151. № 6. С. 1176–1191.

39. Diguseppe J.A. Flow cytometry // *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian.* : Humana Press, 2005. С. 163–172.
40. Dijkstra C.D. и др. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1985. Т. 186. № 3. С. 409–419.
41. Dou L. и др. Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder // *Front. Immunol.* 2020. Т. 10. С. 3112.
42. Doyle A.G. и др. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- γ // *Eur. J. Immunol.* 1994.
43. Duluc D. и др. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells // *Blood.* 2007. Т. 110. № 13. С. 4319–4330.
44. Elchaninov A. и др. Molecular survey of cell source usage during subtotal hepatectomy-induced liver regeneration in rats // *PLoS One.* 2016.
45. Elchaninov A. V. и др. Dynamics of macrophage populations of the liver after subtotal hepatectomy in rats // *BMC Immunol.* 2018.
46. Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J. Origin and Functions of Tissue Macrophages // *Immunity.* 2014.
47. Fabrick B.O. и др. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria // *Blood.* 2009.
48. Ferrante C.J. и др. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling // *Inflammation.* 2013.
49. Fogg D.K. и др. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells // *Science* (80-.). 2006. Т. 311. № 5757. С. 83–87.
50. Fujiwara N., Kobayashi K. Macrophages in inflammation // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2005.
51. Furth R. van и др. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. // *Bull. World Health Organ.*

1972.

52. Geissmann F., Jung S., Littman D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties // *Immunity*. 2003. T. 19. № 1. С. 71–82.

53. Gensel J.C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury // *Brain Res*. 2015. T. 1619. С. 1–11.

54. Gieseck R.L. и др. Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis // *Immunity*. 2016.

55. Ginhoux F., Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells // *Immunol. Cell Biol*. 2010. T. 88. № 4. С. 387–392.

56. Godin I., Cumano A. The hare and the tortoise: An embryonic haematopoietic race // *Nat. Rev. Immunol*. 2002.

57. Goh Y.P.S. и др. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2013.

58. Gomez Perdiguero E. и др. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors // *Nature*. 2015a.

59. Gomez Perdiguero E. и др. The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor // *Immunity*. 2015b.

60. Gonzalez-Dominguez E. и др. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo // *J. Leukoc. Biol*. 2015.

61. Goossens P. и др. Membrane Cholesterol Efflux Drives Tumor-Associated Macrophage Reprogramming and Tumor Progression // *Cell Metab*. 2019.

62. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat. Rev. Immunol*. 2005.

63. Gottfried E. и др. Expression of CD68 in non-myeloid cell types // *Scand. J. Immunol*. 2008.

64. Grau V. и др. Monocytes in the rat // *Immunobiology*. : Elsevier GmbH, 2000. С. 94–103.

65. Graubardt N. и др. Ly6Chi monocytes and their macrophage descendants

regulate neutrophil function and clearance in acetaminophen-induced liver injury // Front. Immunol. 2017.

66. Guerrero A.R. и др. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice // J. Neuroinflammation. 2012. Т. 9. С. 40.

67. Williams M. и др. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF // J. Exp. Med. 2013.

68. Williams M., Scott C.L. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? // Nat. Rev. Immunol. 2017.

69. Guillot A., Tacke F. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights // Hepatol. Commun. 2019. Т. 3. № 6. С. 730–743.

70. Haldar M., Murphy K.M. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages // Immunol. Rev. 2014.

71. Hashimoto D. и др. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes // Immunity. 2013. Т. 38. № 4. С. 792–804.

72. Haskó G. и др. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors // Pharmacol. Ther. 2007.

73. Haubrich W.S. Kupffer of Kupffer cells. // Gastroenterology. 2004. Т. 127. № 1. С. 16.

74. He Y. и др. Flow cytometric isolation and phenotypic characterization of two subsets of ED2⁺ (CD163) hepatic macrophages in rats // Hepatol. Res. 2009.

75. Helming L., Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion // Trends Cell Biol. 2009.

76. Hoeffel G. и др. C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages // Immunity. 2015a. Т. 42. № 4. С. 665–678.

77. Hoeffel G. и др. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. // Immunity. 2015b. Т. 42. №

4. C. 665–78.

78. Hoeffel G., Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages // *Front. Immunol.* 2015.

79. Hoeffel G., Ginhoux F. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages // *Cell. Immunol.* 2018.

80. Holness C.L., Simmons D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins // *Blood*. 1993. T. 81. № 6. C. 1607–1613.

81. Holt M.P., Cheng L., Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. // *J. Leukoc. Biol.* 2008. T. 84. № 6. C. 1410–21.

82. Howell D.N. и др. Differential expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) by mononuclear phagocyte populations // *J. Leukoc. Biol.* 1994. T. 55. № 4. C. 536–544.

83. Ikarashi M. и др. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages // *J. Leukoc. Biol.* 2013. T. 94. № 6. C. 1325–1336.

84. Ingersoll M.A. и др. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets // *Blood*. 2010. T. 115. № 3. C. e10.

85. Italiani P., Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation // *Front. Immunol.* 2014a. T. 5. № DEC. C. 514.

86. Italiani P., Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. // *Front. Immunol.* 2014b. T. 5. № DEC. C. 514.

87. Jaatinen T., Laine J. Isolation of Mononuclear Cells from Human Cord Blood by Ficoll-Paque Density Gradient // *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 2007.

88. Jablonski K.A. и др. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages // *PLoS One*. 2015.

89. Jakubzick C. и др. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes // *Immunity*. 2013.

90. Jakubzick C. V., Randolph G.J., Henson P.M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions // *Nat. Rev. Immunol.* 2017.
91. Jenkins S.J. и др. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of T H2 inflammation // *Science* (80-.). 2011.
92. Jetten N. и др. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo // *Angiogenesis.* 2014.
93. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: From pathogenesis to novel therapeutic strategies // *Cell. Mol. Immunol.* 2016.
94. Karlin Raja Karlmark Ralf Weiskirchen Henning W. Zimmermann Nikolaus Gassler Florent Ginhoux Christian Weber. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis - Karlmark - 2009 - *Hepatology* - Wiley Online Library [Электронный ресурс]. URL: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.22950> (дата обращения: 06.04.2020).
95. Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages // *Exp. Hematol.* 2009.
96. Kinoshita M. и др. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice // *J. Hepatol.* 2010. Т. 53. № 5. С. 903–910.
97. Kitani H. и др. A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells // *J. Immunol. Methods.* 2010.
98. Kopf M., Schneider C., Nobs S.P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells // *Nat. Immunol.* 2015.
99. Krenkel O. и др. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis // *Hepatology.* 2018. Т. 67. № 4. С. 1270–1283.
100. Kurowska-Stolarska M. и др. IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation // *J. Immunol.* 2009.
101. Li P. и др. The role of Kupffer cells in hepatic diseases // *Mol. Immunol.*

2017. T. 85. C. 222–229.

102. Li P. zhi и др. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells // *Immunol. Lett.* 2014.

103. Liaskou E., Wilson D. V., Oo Y.H. Innate immune cells in liver inflammation // *Mediators Inflamm.* 2012.

104. Linder S. и др. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages // *J. Cell Sci.* 2000.

105. Liu D. и др. Recent advances in endotoxin tolerance // *J. Cell. Biochem.* 2019.

106. Liu X. и др. Is CD47 an innate immune checkpoint for tumor evasion? // *J. Hematol. Oncol.* 2017.

107. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2020.

108. Maciorowski Z., Chattopadhyay P.K., Jain P. Basic multicolor flow cytometry // *Curr. Protoc. Immunol.* 2017.

109. Mantovani A. и др. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends Immunol.* 2004.

110. Mantovani A. и др. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling // *J. Pathol.* 2013.

111. Martinez F.O. и др. Macrophage activation and polarization // *Front. Biosci.* 2008.

112. Martinez F.O., Gordon S. The evolution of our understanding of macrophages and translation of findings toward the clinic // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014a.

113. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment // *F1000Prime Rep.* 2014b. T. 6.

114. McKnight A.J. и др. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family // *J. Biol. Chem.* 1996. T. 271. № 1. C. 486–489.

115. Meyer J. и др. Methods for isolation and purification of murine liver sinusoidal endothelial cells: A systematic review // PLoS One. 2016.
116. Mia S. и др. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype // Scand. J. Immunol. 2014.
117. Michalopoulos G.K. Advances in liver regeneration // Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014.
118. Mills C.D. и др. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // J. Immunol. 2000. T. 164. № 12. С. 6166–6173.
119. Mosmann T.R. и др. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. // J. Immunol. 1986.
120. Mossanen J.C. и др. Chemokine (C-C motif) receptor 2–positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury // Hepatology. 2016. T. 64. № 5. С. 1667–1682.
121. Movita D. и др. Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages // J. Leukoc. Biol. 2012. T. 92. № 4. С. 723–733.
122. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunobiology. Ninth Edition. , 2018.
123. Murray P.J. и др. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines // Immunity. 2014.
124. Murray P.J. Macrophage Polarization // Annu. Rev. Physiol. 2017.
125. Murray P.J., Wynn T.A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization // J. Leukoc. Biol. 2011a.
126. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nat. Rev. Immunol. 2011b.
127. Muschter D. и др. Reactivity of rat bone marrow-derived macrophages to neurotransmitter stimulation in the context of collagen II-induced arthritis // Arthritis Res. Ther. 2015. T. 17. № 1.
128. Nakajima H. и др. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an

alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury // J. Neurotrauma. 2012. T. 29. № 8. С. 1614–1625.

129. Nishiyama K. и др. Mouse CD11b+Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy // PLoS One. 2015.

130. Okizaki S. ichiro и др. Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- β 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice // Biomed. Pharmacother. 2015. T. 70. № С. С. 317–325.

131. Perdiguero E.G., Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages // Nat. Immunol. 2016.

132. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001.

133. Pinhal-Enfield G. и др. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors // Am. J. Pathol. 2003.

134. Porta C. и др. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation // Semin. Immunol. 2015.

135. Pridans C. и др. Macrophage colony-stimulating factor increases hepatic macrophage content, liver growth, and lipid accumulation in neonatal rats // Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 2018.

136. Puengel T. и др. Differential impact of the dual CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc on migration of monocyte and lymphocyte subsets in acute liver injury // PLoS One. 2017. T. 12. № 9.

137. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis // Cell. 2010.

138. Riabov V. и др. Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation // Acta Biomater. 2017.

139. Rivollier A. и др. Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon // J. Exp. Med. 2012.

140. Robinson J.P., International Society for Analytical Cytology. Current protocols in cytometry. : John Wiley, 1997.
141. Roh Y.S. и др. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration // Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 2015. T. 309. № 1. C. G30.
142. Ross M., Pawlina W. Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition. , 2010.
143. Röszer T. Understanding the Biology of Self-Renewing Macrophages // Cells. 2018.
144. Ruffell B., Affara N.I., Coussens L.M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment // Trends Immunol. 2012.
145. Ruffell B., Coussens L.M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer // Cancer Cell. 2015.
146. Sanchez-Madrid F. и др. Mapping of antigenic and functional epitopes on the α - and β -subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and mac-1 // J. Exp. Med. 1983.
147. Schaller E. и др. Inactivation of the F4/80 Glycoprotein in the Mouse Germ Line // Mol. Cell. Biol. 2002. T. 22. № 22. C. 8035–8043.
148. Schittenhelm L., Hilkens C.M., Morrison V.L. β 2 integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function // Front. Immunol. 2017.
149. Schultze J.L. и др. A transcriptional perspective on human macrophage biology // Semin. Immunol. 2015.
150. Schultze J.L., Schmidt S. V. Molecular features of macrophage activation // Semin. Immunol. 2015.
151. Schulz C. и др. A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells // Science (80-.). 2012.
152. Scott C.L. и др. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells // Nat. Commun. 2016. T. 7.
153. Shapouri-Moghaddam A. и др. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease // J. Cell. Physiol. 2018.

154. Sica A. и др. Macrophage polarization in pathology // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015.
155. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas // *J. Clin. Invest.* 2012.
156. Silverstein A.M. Editorial: Ilya Metchnikoff, the phagocytic theory, and how things often work in science // *J. Leukoc. Biol.* 2011.
157. Singla D.K. и др. Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart // *PLoS One*. 2015. Т. 10. № 3. С. e0120739.
158. Singla D.K., Johnson T.A., Tavakoli Dargani Z. Exosome Treatment Enhances Anti-Inflammatory M2 Macrophages and Reduces Inflammation-Induced Pyroptosis in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy // *Cells*. 2019. Т. 8. № 10. С. 1224.
159. Singla D.K., Singla R., Wang J. BMP-7 treatment increases M2 macrophage differentiation and reduces inflammation and plaque formation in Apo E^{-/-} Mice // *PLoS One*. 2016. Т. 11. № 1. С. e0147897.
160. Smedsrod B., Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence // *J. Leukoc. Biol.* 1985.
161. Specht H. и др. Single-cell mass-spectrometry quantifies the emergence of macrophage heterogeneity // *bioRxiv*. 2019. С. 665307.
162. Stein M. и др. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation // *J. Exp. Med.* 1992.
163. Strauss-Ayali D., Conrad S.M., Mosser D.M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection // *J. Leukoc. Biol.* 2007. Т. 82. № 2. С. 244–252.
164. Swartzlander M.D. и др. Immunomodulation by mesenchymal stem cells combats the foreign body response to cell-laden synthetic hydrogels // *Biomaterials*. 2015.
165. Takahashi K., Naito M. Development, differentiation, and proliferation of

macrophages in the rat yolk sac // *Tissue Cell*. 1993.

166. Tauber A.I. Metchnikoff and the phagocytosis theory // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003.

167. Tundup S., Srivastava L., Harn Jr. D.A. Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012.

168. Urbina P., Singla D.K. BMP-7 attenuates adverse cardiac remodeling mediated through M2 macrophages in prediabetic cardiomyopathy. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014. T. 307. № 5. C. H762-72.

169. Vandesompele J. и др. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. // *Genome Biol.* 2002.

170. Varol C. и др. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells // *J. Exp. Med.* 2007. T. 204. № 1. C. 171–180.

171. Viola A. и др. The metabolic signature of macrophage responses // *Front. Immunol.* 2019.

172. Vogel D.Y.S. и др. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared // *Immunobiology*. 2014.

173. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance // *Front. Immunol.* 2014.

174. West M.A., Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. // *Crit. Care Med.* 2002. T. 30. № 1 Suppl. C. S64-73.

175. Worzfeld T. и др. Proteotranscriptomics Reveal Signaling Networks in the Ovarian Cancer Microenvironment // *Mol. Cell. Proteomics*. 2018.

176. Wyler S.L. и др. Monocyte chemoattractant protein-1 is not required for liver regeneration after partial hepatectomy. // *J. Inflamm. (Lond)*. 2016. T. 13. № 1. C. 28.

177. Yin M. и др. Tumor-Associated Macrophages (TAMs): A Critical Activator In Ovarian Cancer Metastasis. // *Onco. Targets. Ther.* 2019. T. 12. C. 8687–8699.

178. Yin S. и др. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3 //

Am. J. Pathol. 2011.

179. Yona S. и др. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis // Immunity. 2013. Т. 38. № 1. С. 79–91.

180. You Q. и др. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury // Biochem. Pharmacol. 2013.

181. Yunna C. и др. Macrophage M1/M2 polarization // Eur. J. Pharmacol. 2020. Т. 877. С. 173090.

182. Zeng W. qun и др. A New Method to Isolate and Culture Rat Kupffer Cells // PLoS One. 2013.

183. Zhang Q.Q. и др. Isolation and culture of single cell types from rat liver // Cells Tissues Organs. 2016.

184. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species // Cell. Immunol. 2014.

185. Zigmond E. и др. Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury // J. Immunol. 2014. Т. 193. № 1. С. 344–353.

186. Zizzo G. и др. Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction // J. Immunol. 2012.