

# МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ У ВЫСОКОУСТОЙЧИВЫХ И НИЗКОУСТОЙЧИВЫХ К ГИПОКСИИ КРЫС ВИСТАР



Джалилова Д.Ш., Косырева А.М., Лохонина А.В., Цветков И.С., Шелков А.Ю., Золотова Н.А., Макарова О.В.  
ФГБНУ «НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына», Москва, Россия

**Введение:** устойчивость к гипоксии взаимосвязана с различиями в течении локальных и системных воспалительных реакций, что обусловлено взаимодействием ключевого фактора, индуцируемого гипоксией – HIF и ядерного фактора NF-κB. Ранее нами было показано, что у низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар, у которых выше экспрессия HIF-1, течение системной воспалительной реакции более тяжелое. Макрофаги являются одними из ключевых клеток, обеспечивающих иммунные реакции. Показано, что активация макрофагов в сторону M1 или M2 фенотипа зависит от активации HIF-1 или HIF-2. Однако в настоящее время данных об иммунофенотипических и функциональных различиях макрофагов костномозгового происхождения у животных с разной устойчивостью к гипоксии в литературе не представлено.

**Цель исследования** – определить молекулярно-биологические и функциональные особенности M0, M1 и M2 макрофагов у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии самцов крыс Вистар.

**Материалы и методы:** Работа выполнена на половозрелых самцах крыс Вистар (n=40). Устойчивость к гипоксии определяли по «времени жизни» до бокового положения в барокамере на критической «высоте» 11500 м, делили животных на высокоустойчивых («время жизни» более 240 сек) и низкоустойчивых («время жизни» менее 80 сек). Среднеустойчивых к гипоксии крыс («время жизни» более 80 сек и менее 240 сек) в экспериментах не использовали. Через месяц после определения устойчивости к гипоксии у животных забирали кровь из хвостовой вены и проводили градиентное центрифугирование.

Полученные клетки культивировали в среде MCSF без добавления факторов активации поляризации для получения M0 макрофагов. Активация макрофагов в направлении провоспалительного (M1) фенотипа была проведена путем культивирования M0 макрофагов с липополисахаридом, а противовоспалительного (M2) – с IL-4, 10, 13. У высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных исследовали уровни экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление (IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, iNOS, Arg1, TGF-β), и генов, регулирующих реакцию на гипоксическое воздействие (HIF-1 и HIF-2) методом ПЦР в режиме реального времени, а также иммунофенотип M0, M1 и M2 макрофагов методом проточной цитофлуориметрии. Статистическую значимость результатов оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Данна.

## Результаты и обсуждение

По результатам проточной цитофлуориметрии показано, что экспрессия CD11b в M0 макрофагах в условиях нормоксии у высокоустойчивых к гипоксии крыс статистически значимо выше по сравнению с низкоустойчивыми животными (рис. 1). При этом различий по остальным исследуемым молекулам (CD68, CD86 и CD163) как в M0, так и в M1, M2 макрофагах у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлено не было.

Однако показано, что в процессе поляризации по M1 или M2 фенотипу выраженные изменения экспрессии CD68, CD86 и CD163 наблюдаются только у высокоустойчивых к гипоксии крыс. В частности, в M2 макрофагах по сравнению с M0 происходит уменьшение экспрессии CD68 и CD163, в то время как по сравнению с M1 – увеличение экспрессии CD86. Экспрессия CD163 также снижается в M1 и M2 макрофагах высокоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с M0.

Таким образом, иммунофенотипы макрофагов костномозгового происхождения у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс различаются. У высокоустойчивых животных на высоком уровне экспрессируется CD11b интегрин, а экспрессия остальных молекул меняется под влиянием факторов M1 и M2 поляризации. При этом у низкоустойчивых к гипоксии крыс CD11b интегрин экспрессируется на низком уровне, а факторы M1 и M2 поляризации не оказывают статистически значимого влияния на экспрессию макрофагами этих крыс остальных изученных молекул.

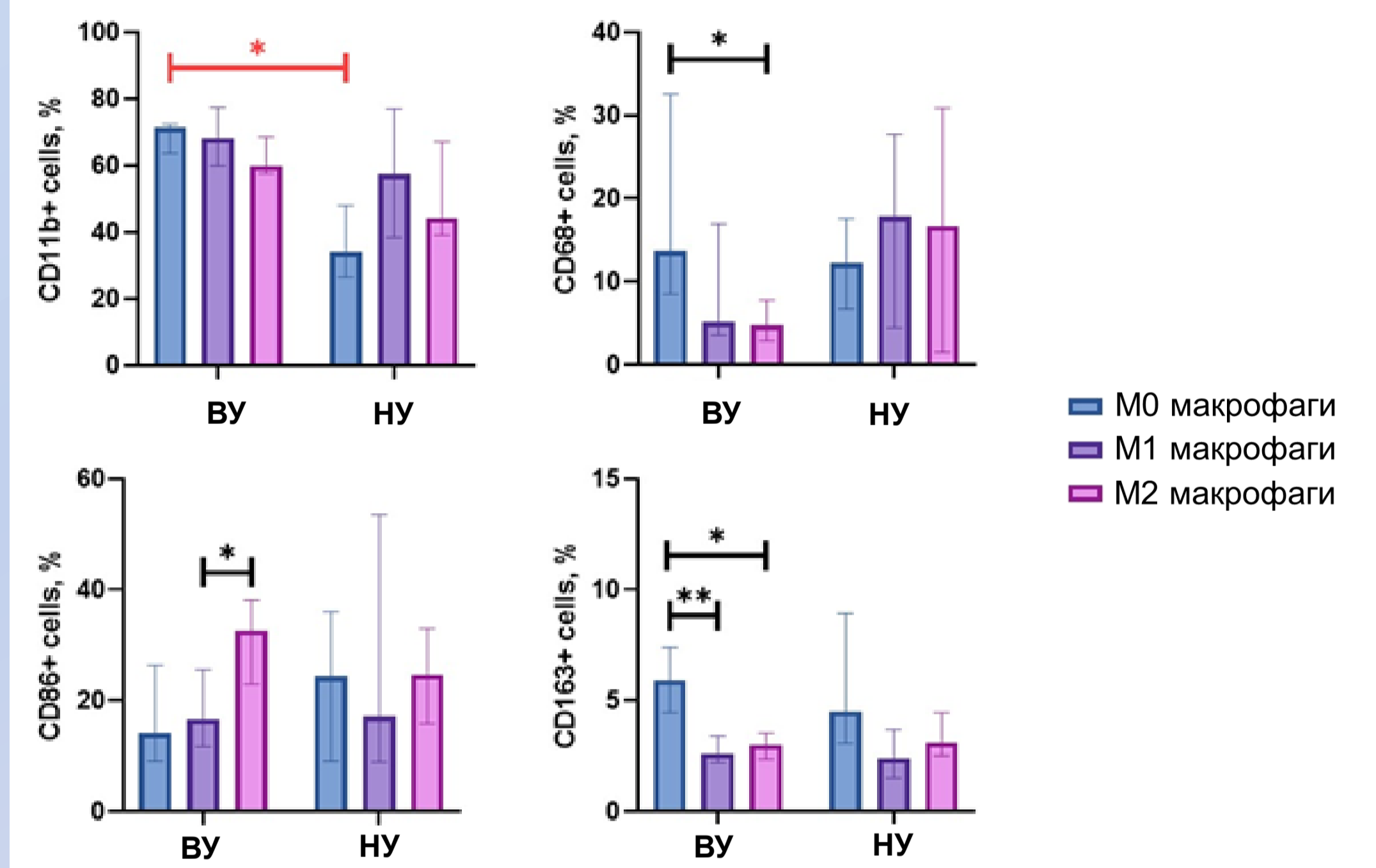


Рис. 1. Иммунофенотипическая характеристика M0, M1 и M2 макрофагов у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар. Ме, 25%-75%, \*p<0,05, \*\*p<0,01

В M0 макрофагах экспрессия провоспалительного цитокина TNFα была статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми (рис. 2). При воздействии факторов M2 поляризации его экспрессия снижалась у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с M0 и M1 макрофагами, а у высокоустойчивых – не изменялась по сравнению с M0 и уменьшалась по сравнению с M1. В то же время увеличение экспрессии TNFα было выявлено только в M1 макрофагах высокоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с M0 макрофагами.

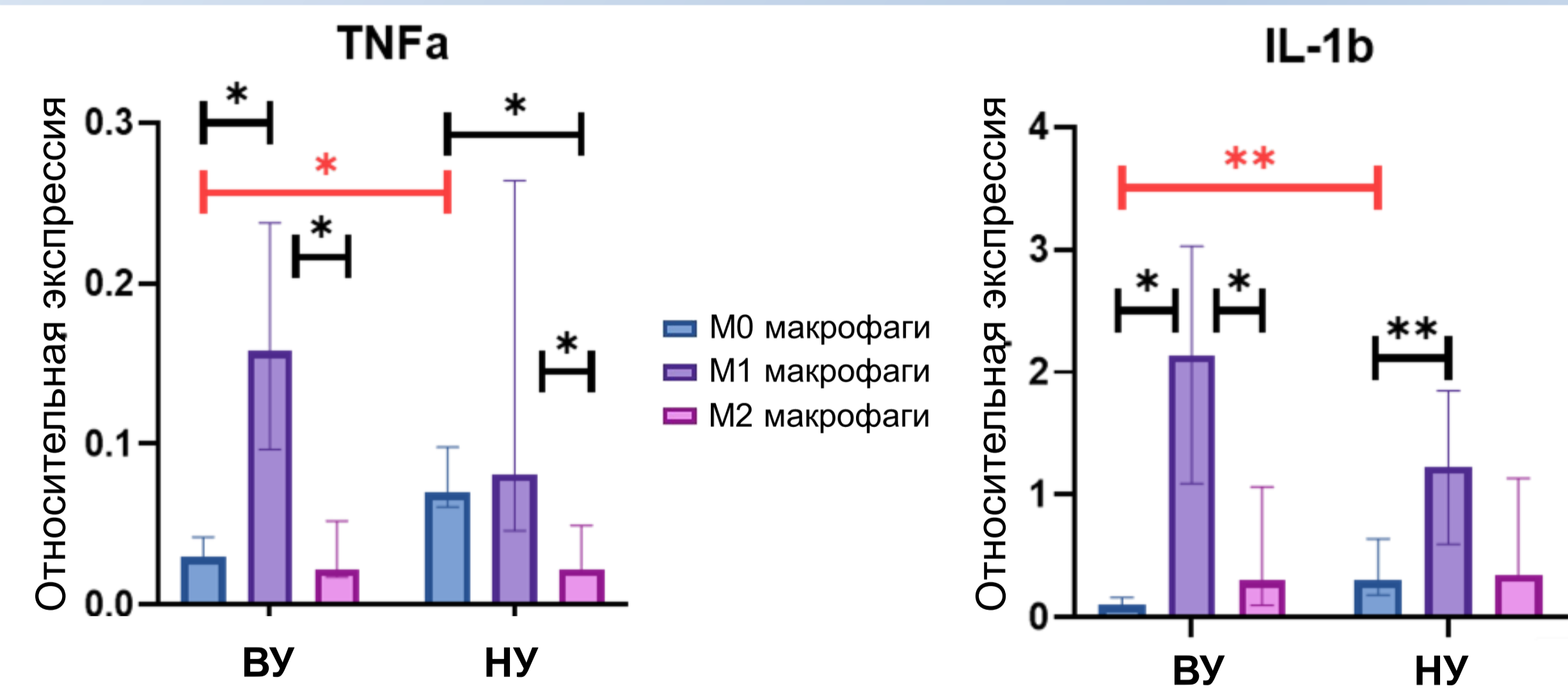


Рис. 2. Относительная экспрессия генов провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β в M0, M1 и M2 макрофагах высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар. Ме, 25%-75%, \*p<0,05, \*\*p<0,01

Экспрессия провоспалительного цитокина IL-1β в M0 макрофагах была статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми (рис. 2). По сравнению с M0 макрофагами, его экспрессия увеличивалась в M1 макрофагах как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс. В M2 макрофагах по сравнению с M1 у высокоустойчивых к гипоксии крыс экспрессия IL-1β статистически значимо снижалась и не отличалась от M0. По экспрессии остальных изученных генов (IL-6, IL-10, iNOS, Arg1, TGF-β) различий между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами выявлено не было.

По результатам ПЦР в режиме реального времени показано, что экспрессия гена HIF-1 была статистически значимо выше в M1 макрофагах у низкоустойчивых к гипоксии крыс. Статистически значимых различий по экспрессии HIF-1 в M0 и M2 макрофагах у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлено не было (рис. 3). При воздействии факторов поляризации экспрессия HIF-1 у животных с разной устойчивостью к гипоксии изменялась сходным образом – в M1 макрофагах увеличивалась и была выше по сравнению с M0 и M2, а в M2 макрофагах не отличалась по сравнению с M0 (рис. 3).

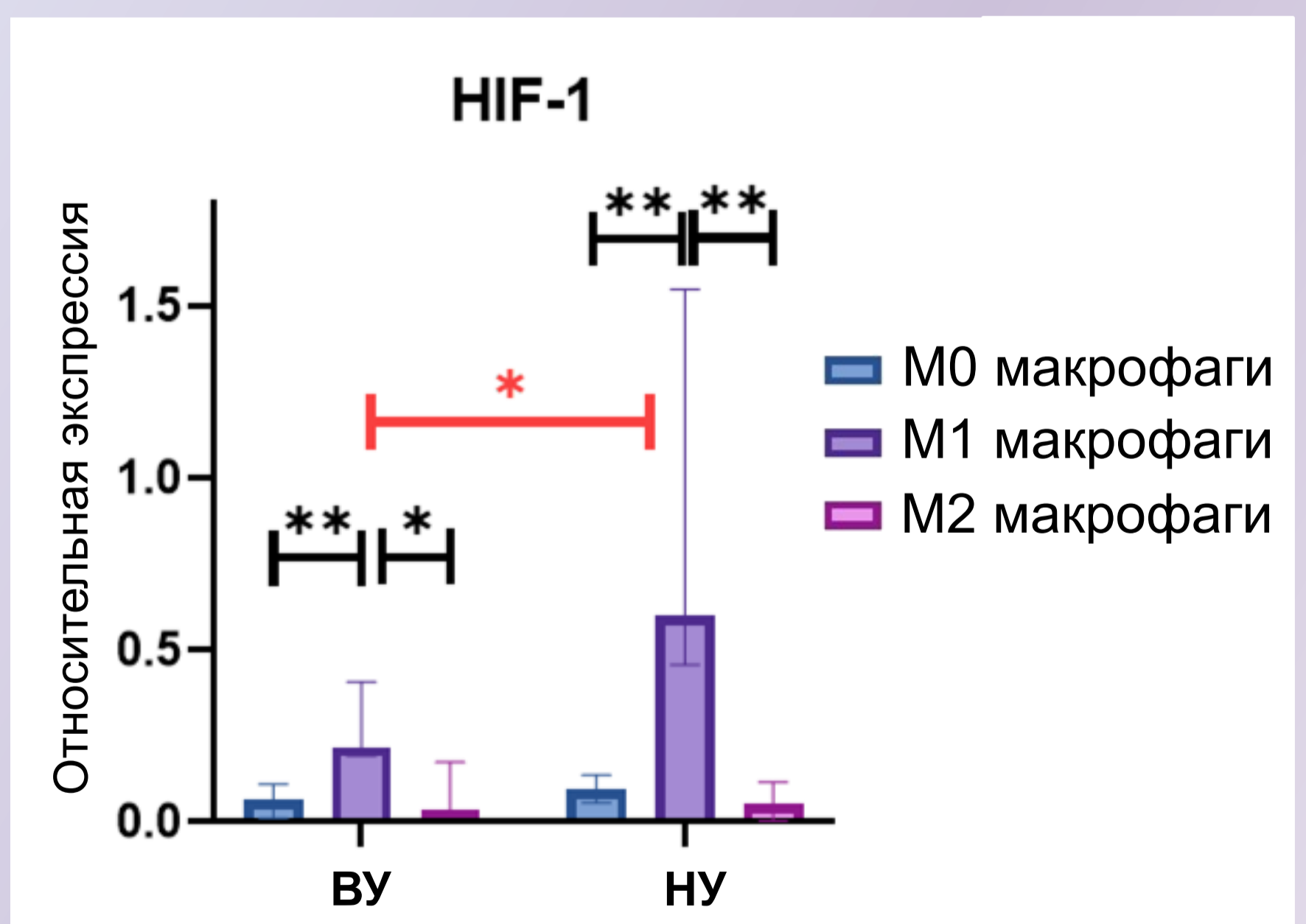


Рис. 3. Относительная экспрессия гена HIF-1, ответственного за реакцию на гипоксическое воздействие, в M0, M1 и M2 макрофагах высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар. Ме, 25%-75%, \*p<0,05, \*\*p<0,01

**Заключение:** выявлены иммунофенотипические и функциональные различия M0, M1 и M2 макрофагов у животных с разной исходной устойчивостью к гипоксии. Показано, что через месяц после определения устойчивости к гипоксии костномозговые M0 макрофаги низкоустойчивых крыс содержали статистически значимо меньше CD11b+ клеток по сравнению с высокоустойчивыми животными. Показано, что у низкоустойчивых к гипоксии крыс в M0 макрофагах статистически значимо выше экспрессия генов провоспалительных цитокинов IL-1β и TNFα, а в M1 макрофагах – фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1. Полученные данные позволят разработать новые подходы к персонализированной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний у людей с учетом исходной устойчивости к гипоксии.