

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



МАКСИМОВА АЛЕКСАНДРА АЛЕКСАНДРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ И
ФИБРОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА IN
VITRO**

14.03.09 — “Клиническая иммунология, аллергология”

диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д-р мед. наук,

Шевела Екатерина Яковлевна

Новосибирск

2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Макрофаги	12
1.1.1. Происхождение макрофагов.....	12
1.1.2. Дифференцировка и поляризация макрофагов.....	13
1.1.3. Поверхностные маркеры.....	17
1.1.4. Секреторная активность макрофагов.....	19
1.1.5. Свойства макрофагов	21
1.2. Участие макрофагов в фиброгенезе	24
1.2.1. Фиброгенез	24
1.2.2. Участие макрофагов в фиброгенезе (данные <i>in vivo</i>)	28
1.2.3. Продукция MMPs и TIMPs	33
1.2.4. Продукция растворимых факторов, регулирующих деятельность фибробластов.....	36
1.2.5. Продукция коллагена макрофагами.....	39
1.2.6. Поглощение деградированного матрикса с помощью рецепторов, расположенных на поверхности.....	41
1.2.7. Влияние на пролиферацию фибробластов	42
1.2.8. Влияние на дифференцировку фибробластов	43
1.2.9. Влияние на продукцию фибробластами ВКМ.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Генерация макрофагов.....	46
2.2. Линия фибробластов.....	47
2.3. Аллостимуляторная активность	48
2.4. Пролиферация фибробластов	48
2.5. Иммуноферментный анализ.....	49
2.6. Проточная цитометрия	50
2.7. Статистическая обработка результатов	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52

3.1. Характеристика макрофагов	52
3.1.1. Морфологическая характеристика макрофагов.....	52
3.1.2. Фенотипическая характеристика макрофагов	53
3.1.3. Продукция цитокинов и хемокинов.....	56
3.1.4. Аллостимуляторная активность макрофагов.....	59
3.2. Фиброгенная активность макрофагов.....	63
3.2.1. Прямое влияние М-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ	63
3.2.2. Опосредованное влияние М-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ	66
3.2.3. Прямое влияние GM-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ	69
3.2.4. Опосредованное влияние GM-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ.....	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Макрофаги (Мф) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, участвующих в регуляции множества процессов в организме. Характерной особенностью Мф является выраженная пластичность, которая проявляется в способности этих клеток изменять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения и подразумевает существование множества переходных состояний между двумя крайними «полюсами» - классически активированными M1 и альтернативно активированными M2 Мф [1].

Моноциты человека дифференцируются в M1 и M2 Мф в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) или макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), соответственно. Однако фенотип Мф зависит не только от дифференцировочного стимула, но и от дальнейших поляризующих сигналов. Мф, дифференцированные M-CSF (про-M2) или GM-CSF (про-M1), в зависимости от поляризующих/активирующих сигналов могут формировать различные функциональные фенотипы: M1 – под влиянием IFN γ и/или липополисахарида (LPS), M2a – IL-4 и IL-13, M2b – LPS в комбинации с иммунными комплексами, M2c – IL-10, TGF- β и глюкокортикоидов и M2d – IL-6 в комбинации с аденозином [2, 3].

Несмотря на большое количество исследований, идентификация различных подтипов Мф у человека представляет сложный вопрос в силу отсутствия специфических маркеров [4]. В настоящий момент не существует универсального метода, который позволил бы определить принадлежность клеток к тому или иному подтипу. Кроме того, в подавляющем большинстве работ исследователи ограничиваются изучением M1 и M2a подтипов, в то время как другие функциональные фенотипы Мф охарактеризованы

недостаточно. Более того, для получения M1 и M2 фенотипов используют разные дифференцировочные факторы (GM-CSF для M1 и M-CSF для M2), что действительно приводит к образованию двух наиболее оппозитных фенотипов. Однако такой подход не позволяет проанализировать роль дифференцировочных/поляризующих сигналов в формировании того или иного функционального фенотипа.

Благодаря своей гетерогенности и пластичности, т.е. способности «переключаться» с одного функционального фенотипа на другой, Мф могут регулировать в организме различные процессы – воспаление, репарацию, ремоделирование в различных тканях, в том числе, развитие и прогрессирование фиброза [5].

Фибротический процесс обладает определенной стадийностью, и ключевую роль на всех стадиях играют фибробласты (Фб) – клетки соединительной ткани, синтезирующие белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Под влиянием различных стимулов/повреждающих факторов покоящиеся Фб активируются и превращаются в миофибробласты (МиоФб), специфическим маркером которых является альфа-гладкомышечный актин (α -SMA). Дифференцировка Фб в МиоФб сопровождается повышением их подвижности и усилением синтеза и продукции белков ВКМ, основным элементом которого является коллаген, и особенно, коллаген I типа. Наряду с продукцией белков ВКМ МиоФб секретируют цитокины, хемокины, факторы роста, а также протеазы, отвечающие за деградацию ВКМ (в частности, матричные металлопротеазы) [6]. После завершения восстановления ткани МиоФб в норме подвергаются апоптозу [7]. Однако при хроническом повреждении/воспалении МиоФб продолжают персистировать, что приводит к избыточной продукции и отложению ВКМ в органах и тканях с последующим изменением их нормальной структуры и развитием фиброза [8, 9, 10, 11]. С другой стороны, недостаточность фиброгенеза может приводить к появлению хронически незаживающих ран [12].

Фибротические процессы являются частью патогенеза множества патологических состояний, включая цирроз печени, идиопатический фиброз легких, фиброз почек, а также осложнения коронавирусной инфекции COVID-19. Однако на сегодняшний день не существует достаточно эффективных способов борьбы с развитием фиброза. В основном поиск методов лечения данных патологических состояний сосредоточен на попытках ингибировать продукцию миофибробластами белков ВКМ, однако такой подход не позволяет достичь значимого терапевтического эффекта [13]. Более перспективное решение данной проблемы связывают с развитием подходов, направленных на стимуляцию клеток, ответственных за деградацию и захват компонентов ВКМ [13], в частности, определенных типов Мф.

Действительно, первоначальный взгляд на популяцию M2 Мф как клетки исключительно с профиброгенной активностью [14] претерпел существенные изменения. Показано, что профиброгенный эффект могут оказывать Мф с M2a фенотипом, которые способны усиливать процессы отложения ВКМ и дифференцировку Фб в МиоФб [15]. В то же время считается, что M2c Мф могут проявлять антифиброгенные свойства и ограничивать фиброз [16]. Однако подавляющее большинство работ по изучению про- и антифиброгенных свойств Мф выполнено на экспериментальных животных, тогда как роль различных функциональных фенотипов Мф человека и механизмы их регуляторного влияния на фибротический процесс остаются практически неизученными.

На сегодняшний день имеются единичные работы, выполненные *in vitro* на Мф человека, в которых показан профиброгенный потенциал M2a Мф и антифиброгенный M1. Таким образом, исследования про- и антифиброгенных свойств Мф человека ограничены только двумя оппозитными подтипами. Кроме того, предполагают, что Мф могут принимать более сложное участие в регуляции фибротического процесса, и разные подтипы играют различную роль на определенном этапе фиброза

[17]. Наконец, недостаточно исследованы механизмы реализации про/антифиброгенной активности Мф. Таким образом, изучение влияния различных функциональных фенотипов Мф человека, получаемых из моноцитов периферической крови, на функциональную активность Фб представляется, несомненно, актуальным.

Все вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования: охарактеризовать функциональные фенотипы и фиброгенную активность макрофагов человека, генерируемых *in vitro* под действием различных дифференцировочных и поляризующих сигналов.

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

1. Охарактеризовать морфологию, фенотип и цитокин-продуцирующую активность М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф, поляризованных липополисахаридом (M1), IL-4 (M2a), дексаметазоном (M2c) и взаимодействием с апоптотическими клетками (M2(LS)).
2. Оценить аллостимуляторную активность М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф с различными функциональными фенотипами (M1, M2a, M2c и M2(LS)) в смешанной культуре лейкоцитов.
3. Исследовать продукцию вовлеченных в фиброгенез факторов (протеаз внеклеточного матрикса, тканевых ингибиторов металлопротеиназ и коллагена) в культурах M1, M2a, M2c и M2(LS), дифференцированных под действием М-CSF- и GM-CSF.
4. Изучить влияние растворимых факторов М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф с различными функциональными фенотипами (M1, M2a, M2c и M2(LS)) на функции дермальных Фб (пролиферацию, дифференцировку и продукцию коллагена).

Научная новизна

Впервые показано, что М-CSF-дифференцированные Мф в ответ на LPS/IFN γ отличаются более низким уровнем экспрессии CD86 и продукции IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, TNF α по сравнению с GM-CSF-дифференцированными M1 Мф. Продemonстрировано, что в ответ на противовоспалительные поляризующие стимулы (IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) Мф демонстрируют высокий уровень экспрессии M2-ассоциированных маркеров (CD163, MerTK) и сниженный – по сравнению с M1 – уровень продукции IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN γ вне зависимости от условий дифференцировки (М-CSF/GM-CSF). Впервые показано, что Мф M2 фенотипа независимо от дифференцировочного (М-CSF/GM-CSF) и поляризующего (IL-4, дексаметазон (Dex), эффероцитоз) стимула отличаются от оппозитного M1 фенотипа сниженной способностью стимулировать пролиферативный ответ аллогенных Т-лимфоцитов. Установлено, что М-CSF-дифференцированные Мф, независимо от дальнейшей поляризации, характеризуются высоким уровнем продукции матричной металлопротеиназы 9 (MMP-9), крайне низким уровнем TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1, в то время как GM-CSF-дифференцированные Мф отличаются низким соотношением MMP-9/TIMP-1, величина которого варьирует в зависимости от поляризующего стимула (максимум - M2c(Dex) и минимум - M2(LS)). Получены новые данные о том, что Мф человека различных функциональных фенотипов способны продуцировать коллаген I типа, и выявлена зависимость уровня секреции коллагена от условий дифференцировки (М-CSF/GM-CSF). Продemonстрировано, что среди М-CSF-дифференцированных Мф наиболее активными продуцентами коллагена I типа являются M2c(Dex) и M2a(IL-4), среди GM-CSF-дифференцированных Мф – M2(LS). Показано, что M2(LS) проявляют характерную для M2 фенотипа низкую аллостимуляторную активность, при этом отличаются от других M2 клеток более высоким уровнем продукции TGF- β 1, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и

ангиогенина. Впервые продемонстрировано стимулирующее влияние растворимых факторов различных фенотипов GM-CSF-дифференцированных Мф на пролиферативный ответ дермальных Фб, причем уровень стимуляции достигает максимума в присутствии M2c(Dex). Установлен стимулирующий эффект растворимых факторов Мф на дифференцировку Фб, в частности, экспрессию α -SMA и продукцию коллагена I типа дермальными Фб, с наиболее выраженным эффектом в случае M2(LS).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о пластичности Мф человека, в частности, изменении их функционального фенотипа в зависимости от дифференцировочного (M-CSF или GM-CSF) и поляризующего стимулов (LPS, IFN- γ , IL-4, дексаметазон, эффероцитоз). Полученные результаты раскрывают степень вовлеченности дифференцировочных и поляризующих сигналов в модуляцию про-/антифиброгенных свойств Мф и существенно дополняют данные о регуляторном влиянии различных функциональных фенотипов Мф на фиброгенез. Кроме того, охарактеризован уникальный фенотип Мф M2(LS) с высоким профиброгенным потенциалом, который опосредуется продукцией TGF- β 1, TIMP-1 и коллагена I, а также стимулирующим влиянием на дифференцировку Фб. Значение работы в прикладном аспекте заключается в определении нового метода идентификации M1/M2 подтипов Мф, основанном на универсальном интегральном показателе этих клеток - аллостимуляторной активности, то есть способности стимулировать пролиферацию аллогенных Т клеток в смешанной культуре лейкоцитов (Пат. РФ 2717024). Анализ операционных характеристик данного теста показал его высокую чувствительность и специфичность в отношении идентификации M1/M2 подтипов M-CSF и GM-CSF-дифференцированных Мф.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. GM-CSF-дифференцированные макрофаги человека характеризуются выраженной пластичностью и в ответ на поляризующие сигналы формируют

клетки как с M1, так и M2 фенотипами, тогда как M-CSF-дифференцированные макрофаги в большей степени детерминированы к формированию клеток с M2 фенотипами.

2. Эффекты GM-CSF-дифференцированных макрофагов человека на функции фибробластов зависят от поляризующего сигнала, в частности, M2c(Dex) стимулируют преимущественно пролиферацию, а M2(LS) – дифференцировку дермальных фибробластов.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 121 странице машинописного текста, включающего 3 таблицы и 23 рисунка. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 210 литературных источников, в том числе 207 иностранных.

Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора

Высокая достоверность полученных результатов определяется продуманным дизайном исследования, подтверждается использованием различных подходов с автоматизированной оценкой результатов, а также современными методами статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2017, 2019, 2020), Объединенном иммунологическом форуме-2019 (Новосибирск, 2019 г), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2020 г). Апробация диссертации состоялась 3 июня 2021 г на семинаре клинического отдела НИФКИ.

Работа проводилась на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ (руководитель лаборатории д.м.н., профессор, член-корреспондент РАМН Е.Р. Черных). Все исследования выполнялись при непосредственном участии автора в рамках темы НИР «Разработка методологии применения клеточных технологий, направленных на стимуляцию репаративных процессов и модуляцию иммунного ответа при иммунопатологических состояниях» (№ госрегистрации 01201356996), темы НИР «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета» (№ госрегистрации 1021062512015-4) и гранта РРФИ № 19-315-90001

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ, получен 1 патент.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Макрофаги

1.1.1. Происхождение макрофагов

Мф образуются из трех источников: клеток желточного мешка, эмбриональной печени и красного костного мозга. Относительное содержание Мф в ткани зависит от ее типа и возраста организма. В постнатальном периоде Мф большинства органов представляют собой гетерогенную популяцию клеток, происходящих из эмбриональных предшественников (клеток желточного мешка и эмбриональной печени) и моноцитов [18]. Существуют исключения: Мф печени преимущественно дифференцируются из гемопоэтических клеток печени зародыша, а Мф кожи и собственной пластинки слизистой оболочки кишечника в основном имеют миелоидное происхождение [19]. Имеющие эмбриональное происхождение клетки приобретают тканеспецифичные характеристики и поддерживают свою численность за счет пролиферации *in situ* без какого-либо участия моноцитов [18, 20]. К резидентным тканевым Мф относят клетки Купфера, микроглию, альвеолярные Мф, перитонеальные Мф, Мф красной пульпы селезенки [18]. Мф моноцитарного (костномозгового) происхождения развиваются из общих миелоидных предшественников, которые дифференцируются в миелобласты, далее монобласты, про-моноциты и, наконец, моноциты, дифференцирующиеся в Мф после выхода из кровеносного русла в ткань [20]. Количество Мф моноцитарного происхождения резко увеличивается в ткани при воспалении [18]. Так, после острого повреждения печени тетрахлорметаном в поврежденную ткань начинают активно мигрировать моноциты [19], однако Мф моноцитарного происхождения остаются доминирующей популяцией только в течение 72 ч. и уже через 96 ч. полностью исчезают, а их место занимают клетки Купфера, восстановившие свою численность за счет пролиферации [19]. Таким

образом, Мф моноцитарного происхождения являются своеобразной «скорой помощью», призванной запустить процесс репарации ткани и активировать резидентные Мф.

1.1.2. Дифференцировка и поляризация макрофагов

Моноциты человека, выделенные из периферической крови, дифференцируются в Мф в присутствии колониестимулирующих факторов – макрофагального (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального (GM-CSF). Использование того или иного дифференцировочного фактора приводит к значительным различиям в экспрессии генов. Так, было показано, что GM-CSF-дифференцированные Мф характеризуются более выраженной экспрессией генов, способствующих обратному транспорту холестерина (PPAR- γ , LXR- α и ABCG1), а также CCR7 по сравнению с M-CSF-дифференцированными Мф, тогда как последние активнее экспрессируют CD14 [3]. В работе S. Hashimoto и соавт. было продемонстрировано, что GM-CSF-индуцированные Мф отличаются более высоким уровнем экспрессии таких генов, как гены хемокина, полученного из моноцитов, легумаина, синтетазы простагландина D, лизосомального сиалогликопротеина [21]. В другом исследовании было показано, что GM-CSF индуцирует более сильную экспрессию регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), чем IRF5, тогда как M-CSF индуцирует IRF5, но не IRF4 [22]. В результате формируются так называемые M1 (под влиянием GM-CSF) и M2 (под влиянием M-CSF) фенотипы, название которых было предложено по аналогии с Т-хелперами 1 и 2 типа, поскольку M1 Мф индуцируют Th-1 иммунный ответ, а M2 – Th2 [23].

Тем не менее, фенотип Мф зависит не только от дифференцировочного стимула, но и от сигналов микроокружения – цитокинов, хемокинов и других биологических факторов. Поэтому Мф, дифференцированные M-CSF (про-M2) или GM-CSF (про-M1), могут быть далее активированы/поляризованы в различные функциональные фенотипы: M1, M2a, M2b, M2c, M2d. При этом

характер активации Мф не является жестко детерминированным и стабильным, о чем свидетельствует возможность трансформации фенотипов (например, M1 в M2) при изменении спектра активирующих сигналов [24, 25] (Рисунок 1.1.2).

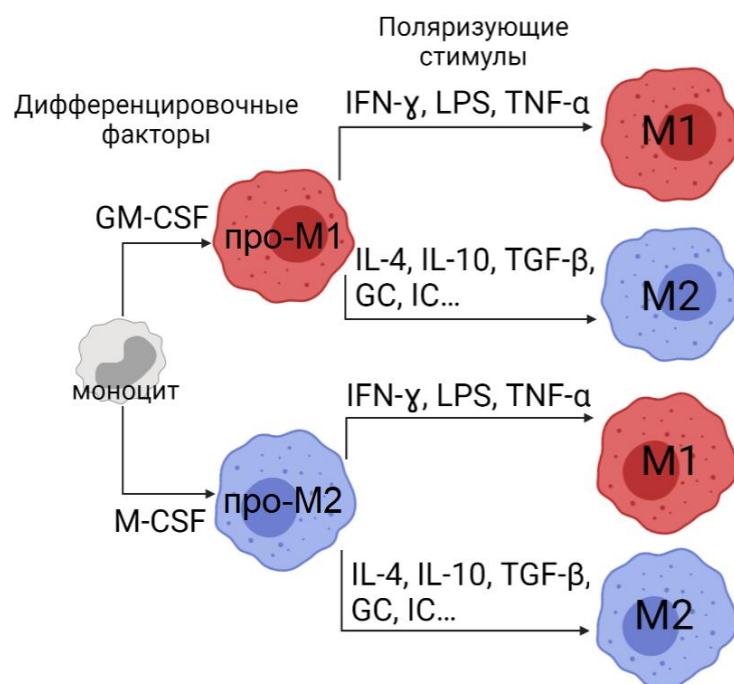


Рисунок 1.1.2 – Схема переключения фенотипов Мф в зависимости от условий микроокружения.

Важно подчеркнуть, что формирующиеся в естественных условиях Мф могут значительно отличаться от получаемых *in vitro* M1 и M2 фенотипов. Например, при стрептококковой инфекции активированные Мф демонстрируют признаки как классической (синтез провоспалительных цитокинов и колониестимулирующих факторов), так и альтернативной активации (IL-1R α и синтез IL-10) [25]. Сочетание признаков классической и альтернативной активации характерно также для Мф кожных ран человека [25]. Таким образом, сложно говорить о каком-либо определенном подтипе Мф *in vivo*, поэтому термины M1, M2a, M2b, и т.д. преимущественно имеют отношение к клеткам, генерируемым *in vitro*, или мышинным Мф, для которых определены точные маркеры, позволяющие разделить между собой

различные подтипы. Более того, некоторые авторы предлагают вместо дихотомической концепции M1/M2 использовать деление на три больших подтипа клеток: классически активированные, регуляторные и ранозаживляющие Mφ [26]. С другой стороны, в последнем руководстве «Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines» для идентификации типа генерируемых макрофагов было предложено отказаться от M1/M2 классификации и указывать в скобках используемый поляризирующий стимул, например, M(IL-4), M(IC), M(IL-10), M(GC), M(IFN γ), M(LPS), поскольку различные сигналы вызывают в Mφ различные транскрипционные программы [27].

Тем не менее, классификация M1/M2, внутри которой различают M1, M2a, M2b, M2c, M2d подтипы Mφ, в настоящий момент остается наиболее употребительной. Для генерации данных функциональных фенотипов *in vitro* используются соответствующие поляризирующие стимулы (Таблица 1.1.2). Так, M1 индуцируются IFN γ , LPS или TNF α и характеризуются выраженным провоспалительным фенотипом [23]. При этом ключевую роль в M1 поляризации Mφ человека играет транскрипционный фактор pSTAT1 и гетеродимер pSTAT1/2), а также IRF5 и в меньшей степени - IRF1 [23, 28, 29]. M2a поляризуются в присутствии IL-4 и IL-13 и характеризуются противовоспалительной активностью. Центральную роль в формировании M2a фенотипа у человека играют pSTAT1, IRF4, гистон-деметилаза, содержащая домен Jumonji-3 (Jdjd3) и SOCS белок 1 (SOCS1) [23, 28]. M2b фенотип индуцируется иммунными комплексами и агонистами TLR или IL-1 β [30]. По данным некоторых авторов, Mφ также приобретают M2b фенотип после поглощения апоптотических нейтрофилов [31, 32]. В отношении транскрипционных факторов, которые принимают участие в поляризации M2b, ключевую роль играет AP1 [33]. M2c генерируются в присутствии IL-10, TGF- β или глюкокортикостероидов (например, дексаметазона). Клетки данного типа иногда также называются «деактивирующими», так как они могут формироваться из M1 с «деактивированным» профилем генов M1 [32].

Транскрипционным фактором в сигнальном каскаде для M2c является pSTAT3, что показано для мышинных Мф, в то время как для Мф человека механизмы транскрипции остаются во многом неясными [23, 33]. Тем не менее, в литературе имеются данные, согласно которым в поляризации M2c принимает участие белок SOCS3, экспрессия гена которого увеличивается по сравнению с неполяризованными Мф [34]. M2d поляризуются под влиянием аденозина и IL-6, а также в условиях опухолевого микроокружения, кроме того, M2d фенотип может быть получен из M1 Мф, обработанных аденозином, что опосредуется рецептором аденозина 2A (A2AR) [28]. Из перечисленных подтипов M2d являются самыми малоизученными.

Таблица 1.1.2 Поляризующие стимулы и факторы транскрипции различных функциональных фенотипов макрофагов человека

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Поляризующие стимулы	IFN γ LPS TNF α	IL-4 IL-13	Иммунные комплексы LPS	IL-10 TGF- β Глюкокортикоиды	Аденозин IL-6
Транскрипционные пути, SOCS белки	STAT1 IRF5 IRF1	STAT1 IRF4 SOCS1	AP1	SOCS3	?
Примечание: суммированы данные [23, 28–30, 32–36]					

Помимо вышеперечисленных подтипов выделяют также иные функциональные фенотипы Мф, обладающие уникальными свойствами и фенотипом, например, тканевые Мф, Мф, фенотип которых индуцируется при поглощении апоптотических клеток, а также Mox (мышинные Мф, индуцируемые окисленным фосфолипидом), M4 (фенотип, индуцируемых CXCL4) и Mhem (мышинные Мф, индуцируемые гемоглобин-гаптоглобиновым комплексом в микроокружении кровотока) [32]. Такие подтипы клеток часто ассоциированы с определенными заболеваниями и патологическими состояниями, такими как атеросклероз или рак.

Характеристика этих подтипов значительно затруднена из-за ограниченных противоречивых данных.

Как уже упоминалось выше, в отличие от Мф мыши, идентификация подтипов Мф человека представляет сложный вопрос в силу отсутствия специфических маркеров. Для характеристики Мф применяют множество подходов, в частности, оценивая экспрессию поверхностных рецепторов, профиль цитокиновой и хемокиновой секреции, транскриптом и т.д.

1.1.3. Поверхностные маркеры

У мышей M1 и M2 фенотипы Мф достаточно четко определяются по экспрессии поверхностных маркеров Ym1/2, Fizz1 и Arg-1, которые специфичны только для M2 клеток, поляризованных IL-4. Что касается Мф человека, то в настоящий момент не существует специфических маркеров, которые бы позволили достоверно идентифицировать различные фенотипы, что вынуждает исследователей анализировать экспрессию множества поверхностных молекул. Наиболее изученными в этом отношении остаются M1, поляризованные IFN γ или его комбинацией с LPS, и M2a, поляризованные IL-4 или его комбинацией с IL-13. Так, в многочисленных исследованиях было показано, что для M1 характерен высокий уровень экспрессии молекул, вовлеченных в активацию и ко-стимуляцию Т-лимфоцитов, таких как МНС II класса, CD80/CD86, CD40, CD64 и CD16 [4]. В свою очередь, Мф с M2 фенотипом и, прежде всего, M2a, характеризуются повышенной экспрессией акцепторных scavenger-рецепторов (CD36, CD163) и маннозного рецептора CD206 [32, 37]. Кроме того, для M2a клеток, генерированных из моноцитов под действием IL-4/IL-13, характерным признаком является повышенная экспрессия CD200R и DC-SIGN (CD209) [38–40]. В исследовании М. Beyer и соавт., в котором с помощью РНК-секвенирования определялись новые маркеры, специфичные для M1 и M2 (M2a) Мф человека, было показано, что CD120b, toll-like receptor TLR2 и signaling lymphocytic activation molecule family member SLAMF7 являются

уникальными маркерами для M1, генерируемых в присутствии GM-CSF и IFN γ , TNF α и LPS, а CD1a, CD1b, CD93, CD226 ассоциированы с M2, поляризованными IL-4 и IL-13 [4]. С другой стороны, все не так однозначно. Так, экспрессия CD206, например, повышается при культивировании в присутствии GM-CSF, поэтому M1, дифференцированные данным фактором, могут также активно экспрессировать маннозный рецептор [2, 41, 42].

Что касается M2b клеток, в качестве характерных маркеров обычно используют CD86 и сфингозин-киназа 1 (SPHK1) [30]. Однако и CD86, и SPHK1 экспрессируются не только на M2b, но и в достаточно высоком количестве на M1, поэтому не могут являться уникальными маркерами клеток этого фенотипа [43]. Помимо этого, для M2b описана экспрессия МНСII (HLA-DR), CD163, CD64 и PD-L1 [44, 45]. Кроме того, для M2b мышей, но не человека, характерна экспрессия поверхностного белка из суперсемейства фактора некроза опухоли LIGHT (TNFSF14, или CD258) [30].

M2c экспрессируют на своей поверхности маркеры, ассоциированные с ангиогенезом, ремоделированием ВКМ и фагоцитозом, такие как CD163, макрофагальный рецептор с коллагеновой структурой MARCO (macrophage receptor with collagenous structure), тирозин-киназа MER (MerTK), а также SLAM [32, 34, 46]. M2c также экспрессируют CD163, который является рецептором гемоглобина [32]. Также в работе E.B. Lurier и соавт. было показано увеличение экспрессии генов CD300E и CD226 в Mф, поляризованных IL-10, по сравнению с неполяризованными M0 клетками, хотя эти маркеры никогда не описываются как специфические для M2c [34].

По фенотипу M2d клеток не так много данных. Известно только, что в отличие от M2a, они не характеризуются высоким уровнем экспрессии маннозного рецептора CD206 и dectin-1 [32, 47].

Обобщенные данные по экспрессии поверхностных маркеров Mф представлены в Таблице 1.1.3

Таблица 1.1.3 Сравнение маркеров различных функциональных фенотипов макрофагов человека

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Поверхностные маркеры	CD80	CD163	CD86	CD14	VEGF-A
	CD86	CD23	IL-4R α	CD163	CD14
	CD68	CD204	MHC II	IL-4R α	CD16
	CD64	CD200R1	PPAR δ	IL-10R	CD68
	MHC II	CD200R1L	CD64	CD206	
	CD36/SR-B3	CD301 (CLEC10A)	LIGHT	CD150	
	CD16 (Fc gamma RIII)	CD209 (DC-SIGN)	SPHK1	(SLAM)	
	CD32 (Fc gamma RII)	IL-1 RII		TLR1	
	CD119 (IFN γ R1)	CXCR1 (IL-8RA)		TLR8	
	CD163	CXCR2 (IL-8RB)		CCR2	
	TLR2	MHC II		MerTK	
	TLR4	CD206		MARCO	
		PPAR γ (NR1C3)			
		DecoyR			
		Dectin-1			
Примечание: суммированы данные [2, 23, 25, 48–53]					

1.1.4. Секреторная активность макрофагов

Мф продуцируют широкий спектр различных веществ, в том числе цитокинов, хемокинов и ростовых факторов. Благодаря «богатому» секретому, эти клетки способны оказывать регуляторное воздействие на множество различных процессов, включая воспаление, репарацию, регенерацию и др. Наиболее охарактеризованными по цитокин-продуцирующей активности остаются M1 и M2a, тогда как в отношении M2b, M2c и M2d представлено ограниченное количество данных. Современные данные о секреторной активности Мф суммированы в Таблице 1.1.4.

Мф с M1 фенотипом характеризуются высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов, в первую очередь, IFN γ , IL-1 β , IL-6, TNF α . В случае M2a, напротив, продукция цитокинов противовоспалительного спектра (IL-4, IL-10, IL-13, IL-33, IL-35, TGF- β) преобладает над провоспалительными. Кроме того, для них также характерен высокий

уровень продукции PDGF-BB и IGF-1, а также таких хемокинов, как CCL17, CCL18, CCL22 [54].

M2b продуцируют как провоспалительные (IL-1 β , IL-6, TNF α), так и противовоспалительные цитокины (IL-10) [30]. Подобно M1 клеткам, они также характеризуются высокой экспрессией индуцибельной NO-синтазы [32] и активной продукцией IL-1 β , IL-6 и TNF α , однако отличаются от них высоким уровнем IL-10 и низким уровнем IL-12, [30]. Активная секреция IL-10 и/или низкое соотношение IL-12/IL-10 являются отличительной особенностью M2b клеток и часто используются в качестве их характеристики [30]. С другой стороны, эти показатели не позволяют разделить между собой M2b, M2c и M2d Мф, так как последние также активно продуцируют IL-10. Еще одной особенностью M2b является продукция CCL1 и CCL2 [30].

M2c характеризуются высоким уровнем продукции противовоспалительных цитокинов и, прежде всего, IL-10 и TGF- β , а также низким уровнем IL-12 [32]. Наряду с этим, Мф этого типа активно продуцируют металлопротеиназы (MMP) и их тканевые ингибиторы (TIMP), что позволяет им принимать участие в ремоделировании ВКМ. В работе L.V. Lurier и соавт. было продемонстрировано, что M2c отличаются высоким уровнем экспрессии генов матричных металлопротеиназ, таких как MMP-7, MMP-8, а также TIMP-1, PCOLCE2 (procollagen C-endopeptidase enhancer), PLOD2 (procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2) и белков ВКМ, например COL22A1, кодирующего альфа-1 цепь коллагена XXII типа, и VCAN, кодирующего протеогликан versican [34].

Что касается M2d, то они характеризуются высоким уровнем продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), IL-10 и TGF- β на фоне низкого уровня продукции провоспалительных цитокинов, TNF α и IL-12 [32].

Таблица 1.1.4 Профиль цитокинов и хемокинов, продуцируемых различными функциональными фенотипами макрофагами человека

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Цитокины	IFN γ , IL-1 β IL-6 IL-12 IL-15 IL-17A IL-18 IL-23 TNF α	IL-4 IL-10 IL-13 IL-33 IL-35 TGF- β IGF-1 IL-1ra EGF	G-CSF GM-CSF IL-1 β IL-6 IL-10 TNF α	IL-10 TGF- β IGF-1 PGE-2 EGF	IL-10 IL-12 IL-6 TNF α TGF- β VEGF
Хемокины	CCL2 CCL3 CCL4 CCL5 CCL8 CCL9 CCL10 CCL11 CCL15 CCL19 CCL20 CCL22 CX3CL1 CXCL1 CXCL2 CXCL3 CXCL5 CXCL9 CXCL10 CXCL11 CXCL13 CXCL16 CXCL8 (IL-8)	CCL1 CCL2 CCL13 CCL14 CCL16 CCL17 CCL18 CCL22 CCL23 CCL24 CCL26 CXCL8 (IL-8)	CCL1 CCL11 CCL17 CCL20 CCL22 CCL24 CXCL1 CXCL2 CXCL3	CCL8 CCL16 CCL17 CCL18 CCL22 CCL24 CXCL13	CCL5 CXCL10 CXCL16
Примечание: суммированы данные [2, 23, 25, 48–53]					

1.1.5. Свойства макрофагов

Мф выполняют функцию иммунного надзора и отвечают за запуск иммунного ответа и активацию лимфоцитов и других воспалительных клеток. При повреждении ткани или развитии инфекции Мф первоначально

имеют воспалительный фенотип и характеризуются активной секрецией провоспалительных медиаторов, таких как $\text{TNF}\alpha$, оксид азота (NO) и IL-1, которые участвуют в активации различных механизмов, способствуя уничтожению патогенных микроорганизмов [55]. Кроме того, активированные Мф продуцируют IL-12 и IL-23, которые имеют решающее значение для поляризации Th1 и Th17 клеток. M1 Мф производят высокотоксичные для микроорганизмов реактивные формы кислорода и азота, включая NO и супероксид [56]. В свою очередь, чрезмерная активация M1 и, как следствие, избыточная продукция данных факторов, имеет большое значение для патогенеза хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний [57]. $\text{TNF}\alpha$, IL-18, IL-12 и IL-23, продуцируемые M1-подобными Мф, были определены как важные медиаторы некоторых хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний, включая болезнь Крона, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и аутоиммунный гепатит [58–60].

Важной функцией M1 Мф является подавление опухолевого роста и клеток с супрессорной активностью, включая опухоль-ассоциированные Мф, миелоидные супрессорные клетки, M2 Мф [61]. M1 Мф также активируют Th1 лимфоциты, усиливая противоопухолевый ответ [62].

В отличие от провоспалительных и противомикробных свойств M1, M2 Мф проявляют сильную противовоспалительную активность и играют важную роль в заживлении ран и фиброзе. Они ограничивают воспаление, вызванное M1 клетками, что имеет решающее значение для активации заживления ран и восстановление гомеостаза тканей. Для этого M2 Мф продуцируют противовоспалительные цитокины и факторы роста, которые стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток и Фб, включая $\text{TGF-}\beta 1$ и PDGF [63]. Они также секретируют хемокины, привлекающие Фб, Th2 лимфоциты и регуляторные Т клетки [64]. Благодаря этому M2 Мф регулируют величину и продолжительность воспалительной реакции и стимулируют ранозаживление. Кроме того, M2 Мф участвуют в развитии

Th2-зависимого иммунного ответа к некоторым внеклеточным паразитам и грибам [65, 66], а также в развитии аллергических реакций [67].

Мф контролируют важные метаболические функции. Так, они регулируют функции адипоцитов, чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе, что является важным фактором при развитии ожирения и диабета 2 типа [68]. Было показано, что по мере прогрессирования ожирения Мф переключаются с М2-подобного фенотипа на классически активированный М1 с сильной провоспалительной активностью [69]. Мф также играют центральную роль в развитии атеросклероза. Исследования показали, воспаление в интиме сосуда и IFN γ стимулируют дифференцировку М1-подобных Мф с провоспалительной активностью, называемых пенстыми клетками, которые вызывают образование нестабильных бляшек [70]. Эти патогенные Мф экспрессируют более высокие уровни scavenger-рецепторов и CD36, способствующих поглощению липопротеинов низкой и очень низкой плотности [71, 72]. Напротив, противовоспалительные цитокины, в частности, IL-10, играют защитную роль, поскольку они блокируют образование патогенных М1-подобных Мф в атеросклеротических бляшках [73].

Что касается отдельных подтипов М2 Мф, то несмотря на то, что все они обладают противовоспалительной активностью, они также имеют некоторые функциональные различия. В частности, М2а не только участвуют в подавлении воспалительной реакции, но и играют важное значение при развитии аллергических реакций и астме [23]. М2b при раке и инфекционных заболеваниях способствуют развитию опухолей и паразитарных, бактериальных и грибковых инфекций, ослабляя иммунный и воспалительный ответ [74, 75]. Помимо этого, известно также, что М2b могут способствовать восстановлению тканей после повреждения спинного мозга и повреждения сердца в модели ишемии/реперфузии [50, 76]. М2с обладают иммунорегуляторными свойствами, а также играют важную роль в репарации, разрешении воспаления и тканевом ремоделировании [29, 32, 36].

M2d обладают проангиогенным действием, а также иммуносупрессорной активностью и способны стимулировать рост и метастазирование опухолей.

1.2. Участие макрофагов в фиброгенезе

1.2.1. Фиброгенез

Фиброгенез является важным механизмом, необходимым для регенерации и репарации, однако длительное повреждение, хроническое воспаление, нарушение обменных процессов вызывают дисрегуляцию данного процесса. С одной стороны, раневое заживление, тканевое ремоделирование и репарация являются защитными механизмами, активируемыми в ответ на стресс и повреждение для того, чтобы поддерживать функционирование органов и систем. С другой стороны, нарушение регуляции физиологической репарации и хроническое повреждение приводят к тканевому фиброзу, массивному отложению ВКМ, образованию шрамов и развитию органной дисфункции [77]. Основные события, инициирующие фиброгенез, включают в себя прямое повреждение эпителиального/эндотелиального барьера, секрецию TGF- β , привлечение в очаг повреждения воспалительных клеток, индукцию реактивных форм кислорода и активацию коллаген-продуцирующих клеток [77].

Ключевыми клетками, участвующими в фиброгенезе считаются МиоФб, поскольку они являются первичным источником ВКМ. МиоФб представляют собой фибробластоподобные клетки, обладающие способностью секретировать белки ВКМ и проявляющие сократительную активность, способствующую уменьшения размера раневого дефекта (контрактильность). Было показано, что МиоФб играют ключевую роль в восстановлении ткани после повреждения, сокращении раневого матрикса, а также в развитии фиброза [78].

Критерии идентификации МиоФб включают в себя несколько параметров. Гистологически данные клетки представляют собой веретенообразные или звездчатые клетки с бледной эозинофильной

цитоплазмой, окруженные перичеллюлярным матриксом, содержащим коллаген и гликозаминогликаны [79]. МиоФб экспрессируют виментин, α -SMA и немusечный миозин, но слабо экспрессируют десмин и гладкомышечный миозин [79]. Кроме того, отличительной особенностью МиоФб является секреция коллагена (преимущественно, I, III, IV и V типа), гликопротеинов (фибронектины, ламинины и тенасцин), протеогликанов (аггрекан, синхроны, перлекан и декорин) и эластина [78].

Под влиянием определенных стимулов множество различных типов клеток могут приобретать, по крайней мере, частичный фенотип МиоФб, что показано для резидентных Фб и различных клеток сосудистой стенки (перicyты, эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц), эпителиальных клеток, а также фиброцитов костного мозга [8, 78], в зависимости от типа поврежденной ткани (Рисунок 1.2.1).

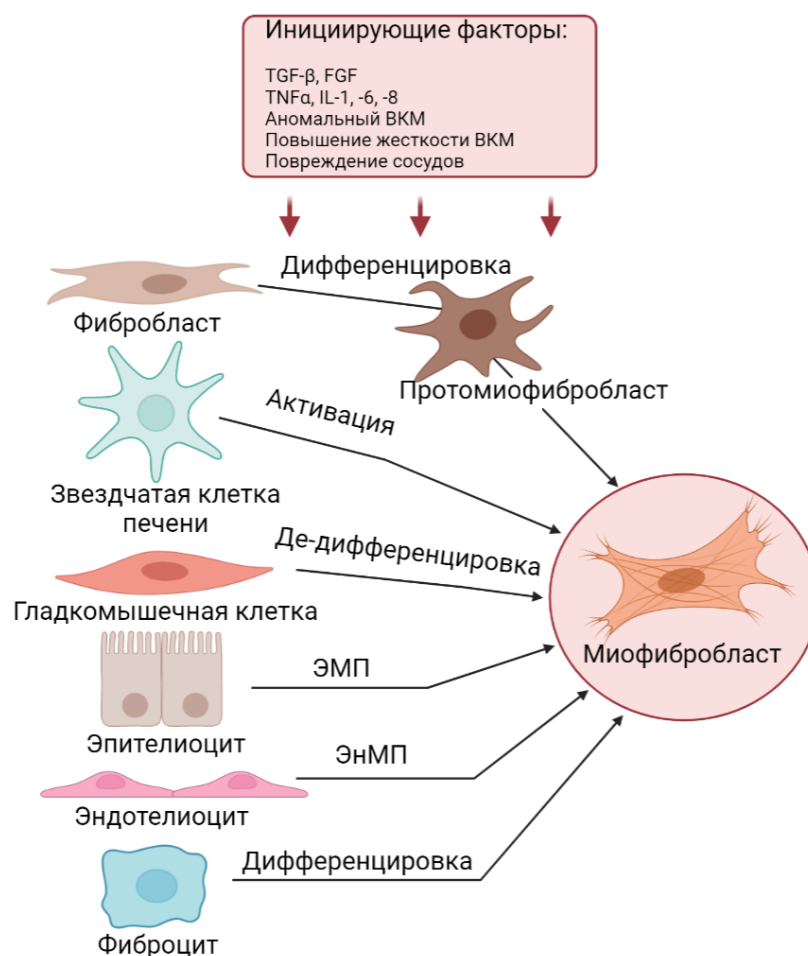


Рисунок 1.2.1 – Предшественники миофибробластов.

Предполагается, что резидентные Фб являются наиболее частым источником МиоФб. В большинстве органов и тканей именно эти клетки преобладают при развитии фиброза (перибронхиальные и периваскулярные адвентициальные Фб в легких, дермальные Фб в коже, кортикальные Фб в почках) [7, 77]. В ответ на повышение жесткости тканей и развитие локальной гипоксии данные клетки приобретают сократительные стрессовые волокна, образуя так называемые «протомиофибробласты» [8]. Они представляют собой промежуточный этап перед образованием дифференцированных МиоФб, характеризующихся экспрессией *de novo* α -SMA. Экспрессия данного маркера обеспечивает дифференцированному МиоФб способность к сократительной активности, которая намного менее выражена у Фб [80].

С другой стороны, было показано, что Фб также могут иметь иное происхождение: из эпителиальных клеток (в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП)), звездчатых клеток печени, перицитов и гладкомышечных клеток сосудов (при регенерации сосудистого русла в результате эндотелиально-мезенхимального перехода (ЭнМП)), фиброцитов, имеющих костномозговое происхождение, (альтернативный источник МиоФб при повреждении кожи, печени, легких и почек) [53, 81–86]. Таким образом, в поврежденных органах и тканях, по-видимому, возможно присутствие МиоФб, имеющих различное происхождение [7].

В нормальных условиях фибробластные клетки характеризуются наличием небольшого количества актин-ассоциированных межклеточных и клеточно-матричных контактов, а также незначительным уровнем продукции ВКМ. Однако цитокины, секретируемые воспалительными и резидентными клетками в очаге повреждения, вызывают их активацию и миграцию в поврежденную ткань [7]. Прежде всего к цитокинам, ответственным за активацию и пролиферацию Фб, относятся IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , PDGF, фактор роста фибробластов (FGF) и TGF- β , альдостерон, тромбин и

эндотелин [78]. После активации МиоФб фактор роста соединительной ткани (CTGF), $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, $\text{TGF-}\beta$, EGF, FGF, IGF-I и IGF-II способствуют пролиферации МиоФб [78]. Другими важными стимулами для этого фенотипического перехода являются изменение состава ВКМ [87–89], повышение его жесткости и, как следствие, развитие локальной гипоксии [77], а также повреждение сосудов, сопровождающееся утолщением сосудистой стенки, продукцией провоспалительных цитокинов и $\text{TGF-}\beta$, тканевой гипоксией, агрегацией тромбоцитов, снижением концентрации оксида азота и ЭНМП [77].

Важным элементом фибротического процесса является апоптоз. Высокий уровень апоптоза был отмечен почти при всех типах фиброза, и было предложено множество механизмов, с помощью которых апоптотические клетки могут определять исходы фиброза [90]. В целом можно выделить два «пика» – в момент переключения с воспалительной фазы фиброза на пролиферативную, когда происходит гибель «отработавших» нейтрофилов и моноцитов, привлеченных в очаг повреждения, и на завершающей стадии восстановления, когда активные МиоФб инактивируются или подвергаются апоптозу [91]. При этом важное значение имеют Мф, которые фагоцитируют апоптотические клетки (эффероцитоз) и которые, как считается, являются ключевыми клетками, способствующими разрешению воспаления [90]. Поскольку такие Мф характеризуются более низким уровнем секреции $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 и высоким уровнем IL-10, $\text{TGF-}\beta$ 1 и IGF-1, предполагают, что Мф такого фенотипа способны инициировать профибротический ответ, придавая устойчивость к апоптозу и способствуя пролиферации Фб и их дифференцировке в МиоФб [90]. Так, например, показано, что у мышей нарушение фагоцитоза апоптотических нейтрофилов макрофагами ассоциируется со снижением продукции $\text{TGF-}\beta$ 1, уменьшением количества МиоФб и сопровождается замедлением заживления раны [92].

Фиброгенез на ранних сроках гестации (ранее 24 недель) у плода характеризуется рядом особенностей, которые обеспечивают заживление ран без образования рубцовой ткани, тогда как раневой процесс на более поздних стадиях беременности и во взрослом организме происходит с формированием рубца и дезорганизацией коллагеновых волокон [9, 93]. Хотя механизмы патогенеза такого заживления ран не до конца понятны, исследования показали, что профиль цитокинов и воспалительных медиаторов [93–96], последовательность сигнального каскада [97–99] и состав белков ВКМ [96, 100, 101] отличаются от тех, которые характерны для взрослого организма [93]. Кроме того, между Фб плода и взрослого существует ряд функциональных различий. Так, Фб плода по сравнению с Фб на поздних сроках беременности и Фб взрослых *in vitro* активнее синтезируют коллаген [94], проявляют большую активность пролилгидроксилазы (фермент, участвующий в синтезе коллагена) [102] и высоко экспрессируют рецепторы к гиалуроновой кислоте [103], что обеспечивает быструю пролиферацию и миграцию клеток в очаг повреждения, а также снижение воспалительной активности в ране [96].

Интересно, что во взрослом организме тоже можно наблюдать заживление ран, напоминающее таковое в раннем гестационном периоде – повреждение слизистой оболочки полости рта характеризуется быстрым восстановлением и реэпителизацией с минимальным образованием рубцов [104].

1.2.2. Участие макрофагов в фиброгенезе (данные *in vivo*)

Как уже упоминалось выше, Мф являются основными клетками-регуляторами фиброгенеза. Большинство авторов в настоящий момент сходятся во мнении, что Мф реализуют про- и антифиброгенные свойства не через один, а через множество различных механизмов. В целом, эти механизмы можно подразделить на прямые и непрямые (Рисунок 1.3). Прямые связаны, прежде всего, с продукцией макрофагами MMPs и их

тканевых ингибиторов, а также белков ВКМ – коллагена, фибронектина. Кроме того, к прямым эффектам относится также экспрессия поверхностных рецепторов, ответственных за фагоцитоз деградированного или интактного коллагена. В свою очередь, Мф могут осуществлять опосредованное воздействие на фиброгенез посредством секреции фиброз-модулирующих цитокинов, таких как TGF- β 1 PDGF, VEGF, IL-10, а также через стимуляцию и активацию иных клеток с про- или антифиброгенной активностью. Наиболее хорошо и подробно изучено участие Мф в процессе фиброгенеза *in vivo* на экспериментальных животных. В этих работах подробно рассмотрены механизмы, с помощью которых Мф могут реализовывать про- и антифиброгенные функции.

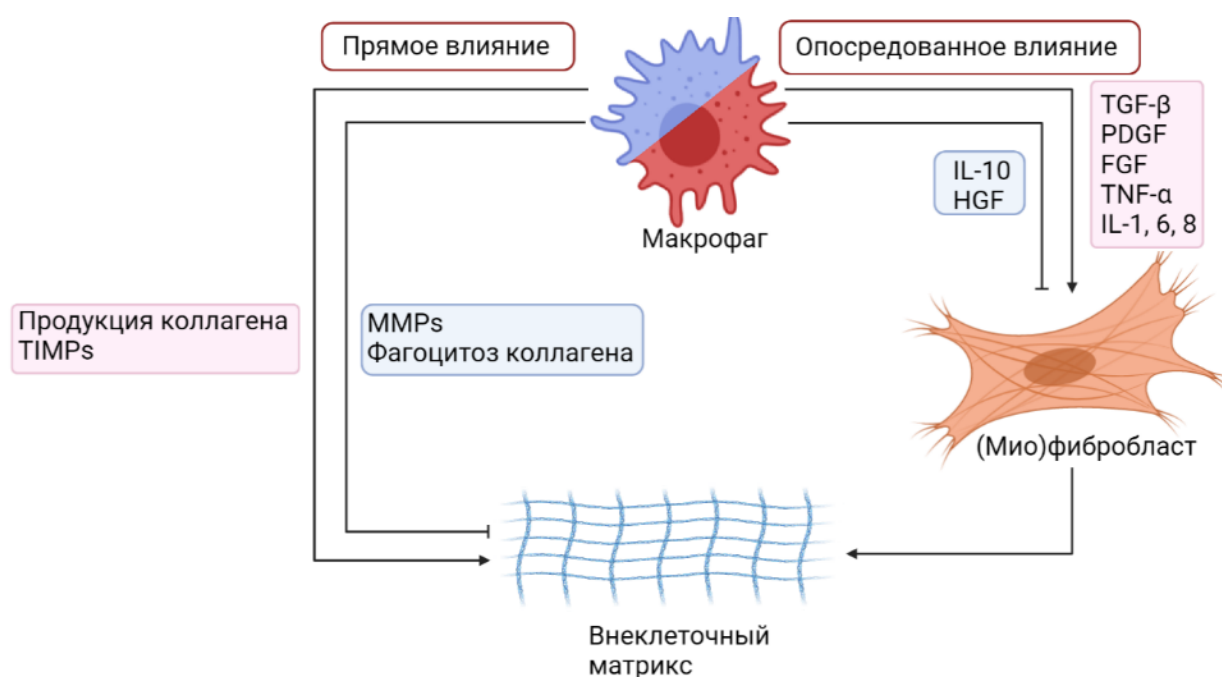


Рисунок 1.2.2 – Возможные механизмы влияния Мф на ВКМ.

Так, ряд экспериментальных исследований указывает на то, что Мф усиливают воспаление печени и вызывают ее фиброз [105]. При этом было показано, что Мф располагаются в непосредственной близости от активированных МиоФб печени во время фиброза и продуцируют такие факторы, как TGF- β 1, IL-1 β , PDGF и CCL2, тем самым способствуя

активации, пролиферации, хемотаксису и выживанию МиоФб [105]. Функциональные исследования, изучающие CCL2 (ключевой хемокин для рекрутирования воспалительных моноцитов), выполненные с применением его ингибиторов и животных, нокаутированных по кодирующему гену, продемонстрировали уменьшение инфильтрации Мф печени и воспаления [106]. J.W. Godwin и соавт. обнаружили, что деплеция Мф у саламандр вызывала нарушение регенерации конечностей, что было связано с нарушением экспрессии генов компонентов ВКМ. При этом регенеративная способность конечностей восстанавливалась при восполнении популяции эндогенных Мф [107]. Нарушение регенерации кожи в модели трансгенных мышей с индуцируемым истощением Мф также было ассоциировано с низкой инфильтрацией Мф, персистенцией нейтрофилов и нарушением неоангиогенеза [108]. Селективная деплеция Мф у мышей, как показали J.S. Duffield и соавт., при прогрессирующем фиброзе печени сопровождалась уменьшением количества МиоФб и снижением фиброза [109]. Аналогичный эффект был продемонстрирован на мышах с блеомицин-индуцированным фиброзом легких [110], и почечным фиброзом, вызванным повреждением в результате ишемии/реперфузии [111]. В исследовании Goren и соавт. деплеция Мф у мышей приводила к отмене реэпителизации раны, снижению формирования коллагена и нарушению ангиогенеза, что ассоциировалось с повышением уровня TNF α и снижением VEGF и TGF- β . Более того, в отсутствие Мф наблюдалась длительная персистенция нейтрофилов, а также снижение раневой контракции [108]. Y. Kanno и соавт. продемонстрировали, что уменьшение Мф клондронатом способствует снижению прогрессирования фиброза кожи у мышей, индуцированного введением блеомицина [112].

С другой стороны, существуют данные, которые указывают на центральную роль Мф в разрешении фиброза. Так, в уже упомянутой ранее работе J.S. Duffield и соавт. было показано, что несмотря на то, что отсутствие Мф во время развития фиброза ограничивает фибротический процесс, деплеция данных клеток на стадии разрешения после хронического

введения CCl₄ приводит к отмене деградации ВКМ и чрезмерному его отложению в тканях [109]. Данные результаты также подтвердило исследование С. Mitchell [113], в котором была продемонстрирована двойственная функция Мф в формировании фиброза: у мышей, нокаутированных по гену CCR2, в период разгара фибротического процесса наблюдался значительно более низкий уровень фиброзных рубцов по сравнению с мышами дикого типа, что ассоциировалось с уменьшением количества инфильтрирующих Мф, однако в период разрешения фиброз регрессировал намного медленнее по сравнению с контролем. В другой работе было показано, что истощение определенной популяции Мф у трансгенных мышей сопровождалось неспособностью ремоделирования фиброза в модели CCl₄-опосредованного фиброза печени [114].

Таким образом, все эти данные свидетельствуют о неоднозначном – как про-, так и антифиброгенном – влиянии Мф обладают на фиброгенез, и способны проявлять активность. Предполагают, что это связано с гетерогенностью и пластичностью данной группы клеток, и определенный фенотип Мф способствует фиброгенезу, в то время как другой фенотип преобладает во время разрешения фиброза [105]. При этом Мф в фибротическом процессе могут принимать различный фенотип в зависимости от происхождения, типа пораженной ткани и повреждающего агента [8], а также локализации повреждения, конкретной области внутри его (центр/периферия) и микроокружения [32]. Действительно, в работе М.А. Gibbons и соавт. было продемонстрировано, что уменьшение фиброза легких было связано со снижением M2-ассоциированных маркеров, таких как arginase-1 и Ym1 [110]. Р. Ramachandran и соавт. показали, что наибольшее значение в разрешении фиброза печени имеет популяция Мф с фенотипом CD11b(hi) F4/80(int) Ly-6C(lo) [114]. В. Shook с соавт. выделили популяцию CD206+CD301b+ Мф, которая имеет решающее значение для активации репаративных процессов на пролиферативной стадии восстановления кожи

[115]. Напротив, клетки с M1 фенотипом обнаруживаются во время ранней воспалительной фазы раневого ответа [8].

В целом, предполагают, что Мф последовательно переключают свой фенотип в соответствии с протекающей стадией. Так, например, M1, которые играют важнейшую роль на первых этапах фиброгенеза, впоследствии переключаются на репаративный M2a фенотип и далее – на M2b и M2c для успешного разрешения процесса. Было показано, что элиминация M1 Мф и/или стимуляция переключения их на M2a фенотип ассоциирована с отменой раневого заживления и патологическим фиброзом [116]. Р. Ramachandran с соавт. также продемонстрировали, что Мф, принимающие участие в разрешении фиброза, имеют общее происхождение с профибротическими Мф, что свидетельствует о наличии механизмов фенотипического переключения, необходимых для физиологического фиброгенеза [114]. Большое исследование, посвященное определению изменения фенотипа Мф во время фибротического процесса, было проведено Mirza и Koh. Авторы выделяли Мф в течение ранозаживления у мышей на 5, 10, 20 день после повреждения. У мышей дикого типа на 5 день обнаруживались клетки с провоспалительной активностью, которые экспрессировали IL-1 β , MMP-9, и NO-синтазу. На 10 день экспрессия этих провоспалительных факторов снижалась, а экспрессия противовоспалительных маркеров, таких как CD206, CD36, IGF-1, TGF- β , и VEGF, повышалась. При этом повышенный уровень экспрессии CD206, CD36 и TGF- β , но не IGF-1 или VEGF наблюдался до 20 дня [117]. Evans и соавт. использовали модель острого повреждения у людей для исследования фенотипа Мф при раневом процессе [118]. Раны были химически индуцированы кантаридином. Жидкость из пузырей собиралась через 16 и 40 ч после повреждения, моделируя воспалительную и разрешающую фазы заживления соответственно. Количество моноцитов/Мф через 40 ч было больше по сравнению с 16 ч. Более того, к этому сроку более чем в 10 раз возрастала доля CD163⁺ Мф. При этом если через 16 ч регистрировались

высокие уровни CCL2(MCP-1), CXCL8(IL-8), TNF α , CCL3 (MIP-1 α), CCL4(MIP-1 β), и CCL11(eotaxin), то через 40 ч в раневой жидкости было повышено содержание хемокинов и TGF- β . Интересно, что в этом исследовании сообщалось о недетектируемых уровнях IL-10 на обеих временных точках, что удивительно, поскольку он считается цитокином, активно продуцируемым противовоспалительными Мф.

Таким образом, основной объем исследований по изучению про- и антифиброгенных свойств Мф выполнен на Мф экспериментальных животных. Однако на сегодняшний день имеется целый ряд свидетельств того, что Мф человека в значительной мере отличаются от Мф животных по функциональным маркерам, сигнальным путям активации, спектру продуцируемых цитокинов и иных растворимых факторов [119–122]. Все эти данные указывают на то, что полученные результаты нельзя в полной мере экстраполировать на Мф человека. Таким образом, поляризационное состояние Мф человека во время фибротического процесса и механизмы, с помощью которых эти клетки регулируют фиброгенез, во многом остаются неизвестными, что определяет несомненную актуальность подобных исследований.

1.2.3. Продукция MMPs и TIMPs

Одним из возможных механизмов влияния различных подтипов Мф на процесс синтеза/деградации ВКМ является продукция матричных металлопротеиназ (MMP) и их тканевых ингибиторов (TIMP). MMP представляют собой семейство эндопептидаз, ответственных за деградацию компонентов ВКМ (преимущественно, коллагена). На сегодняшний день выделяют как минимум 28 различных MMP, которые обладают различной функциональной активностью и специфичностью в отношении разных субстратов [52, 123]. Говоря о роли MMP в фиброгенезе, следует отметить, что MMP могут иметь одну функцию на ранних стадиях процессов заживления ран и совершенно противоположную – в поддержании или

распространении фиброза, поэтому практически невозможно охарактеризовать конкретную ММР исключительно как «про-» или «анти-» фиброгенную [35].

Протеолитическая активность ММР может быть заблокирована некоторыми общими ингибиторами, такими как $\alpha 2$ -макроглобулин, и более специфическими, такими как TIMP. У человека известны четыре ингибитора, среди которых TIMP-1, TIMP-2, и TIMP-4 секретируются внеклеточно, а TIMP-3 связан с ВКМ [124]. Связываясь с активными сайтами ММР, TIMP ингибируют их действие [52]. Высокие значения TIMP-1 были обнаружены при прогрессирующем фиброзе у людей и у экспериментальных животных [125]. Во время разрешения фиброза, напротив, происходит быстрое снижение уровня TIMP и изменение общего баланса ММР/TIMP, сопровождающееся увеличением скорости деградации ВКМ [105]. Критическая роль TIMP-1 в фиброгенезе была подтверждена в исследованиях на мышах, показавших, что сверхэкспрессия TIMP-1 в печени наряду с ускорением фиброгенеза вызывает нарушение реорганизации рубцов [126]. Кроме того, TIMP способны влиять на фиброгенез, регулируя рост различных типов клеток, в частности, стимулируя пролиферацию Фб [127, 128]. Более того, было показано, что TIMP-1 оказывает антиапоптотическое действие на МиоФб печени, и недостаточное количество ингибитора во время репарации может способствовать уменьшению количества МиоФб в печени [105].

Экспрессия ММР и TIMP в организме в клетках и тканях специфична и зависит от многих факторов. В целом, уровень продукции ММР вне патологии достаточно низкий, но он значительно увеличивается в тканях во время заживления ран, репарации, ремоделирования. Синтез ММР и TIMP контролируется различными сигналами микроокружения, такими как цитокины и ростовые факторы, включая интерлейкины, интерфероны, TGF- β , VEGF, PDGF, EGF, FGF, TNF α . Более того, экспрессия различных ММР

может стимулироваться или подавляться сигналами интегринов, белками ВКМ, изменениями формы клеток [124].

Мф продуцируют несколько типов MMP (-1, -2, -7, -8, -9, -10, -12) и их тканевых ингибиторов, преимущественно TIMP-1 и TIMP-2 [32, 123]. Способность дифференцированных Мф продуцировать MMP в высоких концентрациях, как считается, отражает их способность поддерживать тканевой гомеостаз посредством ремоделирования ВКМ, реагируя на локальное тканевое окружение и иммунную активацию [123].

При этом было показано, что продукция MMP и TIMP зависит от стадии созревания/клеточной дифференциации и поляризационного состояния Мф. В целом, экспрессия большинства MMP (-2, -7, -9 и др.) значительно повышается при дифференцировке моноцитов в Мф [123]. Такие дифференцировочные стимулы Мф, как M-CSF или GM-CSF, могут оказывать влияние на спектр продуцируемых MMP и TIMP [129]. Так, например, было показано, что GM-CSF повышает уровень продукции MMP-1, -9, и TIMP-1 [123], а также MMP-12 [52]. Кроме того, существует множество исследований, демонстрирующих, что различные сигналы микроокружения (LPS, IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10 и др.) оказывают влияние на секретируемый профиль MMP и TIMP [52, 123, 130–133]. Тем не менее, полученные данные зачастую противоречивы. Так, в исследовании W.-C. Huang и соавт. было показано, что поляризация Мф в M1 фенотип сопровождается увеличением уровня мРНК MMP-3, -7, -14, -25 [131], тогда как согласно данным A. Bar-Or и соавт. стимуляция Мф LPS и IFN γ приводила к повышению экспрессии MMP-3, но снижению MMP-7, -9, -14, -21 и -25 [130]. В исследовании W.-C. Huang и соавт. поляризация Мф в M2 фенотип сопровождалась увеличением экспрессии мРНК MMP-11, MMP-12, MMP-25, TIMP-3 [131], MMP-1, MMP-9 и TIMP-1 [132], в то время как согласно [52], IL-4 заметно стимулирует экспрессию только MMP-12, но не других металлопротеиназ.

Также было показано, что Мф человека отличаются по своему профилю секретируемых ММР и TIMP от Мф экспериментальных животных [52, 134] и Мф, дифференцированных из промоноцитарных клеточных линий, например, U-937 [123].

1.2.4. Продукция растворимых факторов, регулирующих деятельность фибробластов

Мф характеризуются широким спектром продуцируемых факторов, которые в том числе могут принимать участие в регуляции процессов фиброгенеза. При этом цитокиновый профиль Мф отличается в зависимости от их поляризационного состояния (M1, M2a, M2b, M2c M2d). Цитокины, продуцируемые Мф, могут оказывать различное влияние на фиброгенез, оказывая стимулирующее/ингибирующее воздействие.

Однозначно профиброгенной активностью обладает TGF- β . Среди трех изоформ TGF- β (TGF- β 1, β 2, and β 3), TGF- β 1 лучше всего изучен и является наиболее важным в патогенезе фиброза [135]. Повышенный уровень TGF- β 1 отмечается при фиброзе всех органов и тканей у человека, а сверхэкспрессия фактора у трансгенных мышей приводит к развитию фибротического процесса в коже, легких, печени, почках [94, 135]. Показано, что TGF- β 1 играет ключевую роль в регуляции синтеза ВКМ, клеточной подвижности и модуляции иммунных функций [136]. В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что TGF- β 1 представляет собой наиболее сильный индуктор секреции ВКМ, особенно коллагена [137, 138]. Кроме того, данный фактор уменьшает деградацию матрикса за счет повышения экспрессии TIMPs и ингибирования MMPs, а также усиливает ангиогенез и является хемоаттрактантом для Фб и Мф [94]. Через транскрипционный фактор MyoD TGF- β 1 оказывает стимулирующее влияние на дифференцировку Фб в МиоФб *in vitro* и *in vivo* [139]. Более того, этот ростовой фактор считается самым главным сигналом, отвечающим за инициацию фибротического каскада и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), принимая участие

в дифференцировке не только Фб, но и других клеток-предшественников МиоФб – фиброцитов, эпителиоцитов, эндотелиальных клеток [139]. TGF- β 1 также оказывает стимулирующее влияние на отложение коллагена и повышает уровень α -SMA дозозависимым образом, а его блокада вызывает значительное снижение экспрессии α -SMA (до 60%) [140]. Более того, TGF- β 1 через FAK и PI3K/АКТ киназные пути может оказывать антиапоптотический эффект на МиоФб [141].

Другим цитокином, оказывающим стимулирующее влияние на фиброгенез, является PDGF [139, 142]. Активация сигнального пути PDGF обнаружена при многих фибротических заболеваниях, включая идиопатический фиброз легких и фиброз легких у грызунов. Считают, что PDGF играет ключевую роль в рекрутировании и пролиферации МиоФб в поврежденной ткани [135], а также играет важнейшую роль в стимуляции деления, выживаемости и миграции МиоФб при многих заболеваниях, связанных с фиброзом [143]. Мф способны к продукции данного ростового фактора. Более того, в некоторых работах указывается, что именно PDGF, а не TGF- β 1, является главным цитокином, с помощью которого M2 Мф человека, стимулированные IL-4, реализуют свою профиброгенную функцию [104].

Среди других факторов роста, продуцируемых Мф и обладающих профиброгенной активностью, выделяют FGF, VEGF, IGF [144]. Повышение уровня циркулирующего IGF-1 и IGF-2 наблюдалось у пациентов со склеродермией, ассоциированной с тяжелым повреждением кожи, и фиброзом легких [145, 146], при этом IGF-2 дозозависимым образом стимулировал продукцию коллагена и фибронектина в Фб, не влияя на их пролиферативный ответ [146]. С другой стороны, роль ростовых факторов в развитии фибротического процесса в большинстве случаев не так однозначна. Так, VEGF, с одной стороны, может оказывать стимулирующий эффект на пролиферацию и активацию Фб и необходим для

дифференцировки МиоФб [147], а с другой – играет важную роль в разрешении фиброза [148, 149].

Фактор роста гепатоцитов (HGF), напротив, является эндогенным антифиброгенным фактором [150]. Несмотря на название, он широко экспрессируется во многих тканях в ответ на повышение продукции TGF- β 1. Основными эффектами HGF является антифиброгенная, противовоспалительная и прорегенеративная активность, а также ингибирование дифференцировки МиоФб [151]. Через сигнальные пути, вовлекающие Grb2, PI3K/Akt, MAPK, и STAT3, HGF ингибирует дифференцировку Фб, эпителиальных и эндотелиальных клеток в МиоФб, частично препятствуя TGF- β сигналингу [135]. Интересно, что TGF- β 1 также способен ингибировать действие HGF, если его концентрация в ткани во много раз превышает HGF [77].

В вопросе цитокиновой регуляции фиброза многое остается неясным. Имеющиеся данные указывают на двойственные эффекты цитокинов в зависимости от стадии фибротического процесса и его локализации. Так, показана прямая взаимосвязь уровня IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-17A, IFN γ с развитием патологий, ассоциированных с фиброзом, у животных и человека [135, 139, 152, 153]. Данные цитокины стимулируют дифференцировку Фб, ЭМП и ЭнМП и продукцию коллагена через TGF- β 1-зависимый механизм [139, 154, 155]. IL-1 β и IL-17A также способны индуцировать продукцию TIMP-1 [156]. С другой стороны, существуют исследования, указывающие на антифиброгенные свойства данных цитокинов. Например, М.М. Мiа и соавт. продемонстрировали, *in vitro* ингибирующее влияние IL-1 β на профиброгенные эффекты TGF- β 1, что не согласуется с результатами, полученными *in vivo* [157]. IL-6 и IFN γ , посредством активации JAK1 и STAT-3, MAPKs и PI3 киназ, могут оказывать стимулирующее влияние на продукцию MMP [52]. TNF α подавляет экспрессию гена α 1-цепи коллагена I [51] и наряду с IFN γ является перспективным кандидатом для лечения идиопатического фиброза легких [135, 158], а IL-17A *in vitro* оказывает

антифиброгенный эффект, способствуя снижению уровня экспрессии коллагена и CTGF [159, 160].

IL-4 и IL-13 считаются мощными медиаторами фиброза [135]. Их профиброгенный эффект был показан при фиброзе печени [161, 162], легких [139, 163, 164], кожи [165], болезни Крона [139]. Кроме того, IL-4 и IL-13 являются поляризующими стимулами M2a Мф, ассоциированных с фиброзом в ряде органов и тканей [135].

В свою очередь, IL-10, наоборот, оказывает антифиброгенный эффект и способствует разрешению фибротического процесса. Он подавляет продукцию коллагена, стимулирует экспрессию некоторых ММР, ингибирует дифференцировку Фб в MioФб [139, 166–168]. Кроме того, высокий уровень продукции IL-10 M-CSF-дифференцированными Мф человека прямо коррелирует с дедифференцировкой MioФб в неактивные Фб и сопровождается снижением экспрессии мРНК белков ВКМ и потерей α -SMA [169]. С другой стороны, в ряде исследований продемонстрированы профиброгенные эффекты IL-10 [170, 171], или отсутствие влияния цитокина на фиброз [172].

1.2.5. Продукция коллагена макрофагами

Коллаген является превалирующим компонентом ВКМ. Он играет важную структурную роль и во многом обуславливает механические свойства, организацию и форму тканей [173]. В настоящее время у человека описано 28 типов коллагенов, которые кодируются более чем 40 генами (коллагены I–XXVIII). Общей структурной особенностью всех типов является наличие одного или более доменов, содержащих тройную спираль (α цепь), которая может составлять как большую часть их структуры (96% для коллагена I), так и в некоторых случаях менее 10% (коллаген XII) [174, 175]. Однако различные типы коллагена отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности, а также по степени модификации — интенсивности гидроксирования или гликозилирования. Разнообразие

семейства коллагенов дополнительно увеличивается благодаря наличию нескольких α -цепей, разных молекулярных изоформ и супрамолекулярных структур для одного типа коллагена, а также использованию альтернативных промоторов и альтернативного сплайсинга [173]. Коллаген присутствует в норме во множестве тканей, включая дерму, костную ткань, сухожилия, связки [176], хрящи, стенки сосудов [177], а увеличение его количества связано с развитием фиброза. При этом считается, что важнейшее значение имеют фибриллярные коллагены, и особенно коллаген I типа [178]. Так, продемонстрирована вовлеченность коллагена I типа в патогенез фиброза легких и печени, системной склеродермии и гипертрофических рубцов [179].

Ранее считалось, что все коллагены секретируются исключительно Фб, однако теперь известно, что определенные типы коллагенов могут производиться многочисленными эпителиальными клетками [173]. Более того, Мф, участвующие в регуляции процессов фиброгенеза и репарации ткани, способны к самостоятельной секреции коллагена и фибронектина. В ряде исследований показано, что Мф продуцируют фибронектин, протеогликаны и компоненты базальной мембраны, такие как ламинин [180].

На животных моделях было продемонстрировано, что Мф экспрессируют мРНК коллагена и изоформ коллаген-ассоциированных генов, а также способны продуцировать различные типы коллагена, в частности, коллаген I типа. Более того, продуцируя коллаген, Мф напрямую способствовали развитию сердечного фиброза [181]. В недавних работах также было показано, что продукция коллагена Мф является важным звеном патогенеза фиброза и регенерации [182, 183].

Другие исследования, проведенные уже на Мф человека, также обнаружили способность этих клеток продуцировать коллаген. В работе М. Schnoor и соавт. было продемонстрировано, что Мф, полученные из моноцитов периферической крови, характеризуются экспрессией мРНК всех типов коллагенов за исключением XIII и XXII. При этом гены, кодирующие цепи коллагена VI, VIII, XI, XVIII и XXIV типов, экспрессировались в

большом количестве, тогда как гены, кодирующие цепи коллагена типов II и III, экспрессировались на очень низких уровнях. В этом же исследовании авторы с помощью вестерн-блоттинга определили, что Мф способны продуцировать коллаген VI типа [184]. В другой работе с помощью методики комбинированной флуоресценции было показано, что Мф в стенке атеросклеротического сосуда экспрессируют коллаген типа VIII. При этом, при культивировании моноциты человека продуцировали коллаген VIII типа, и эта способность сохранялась в течение нескольких недель после приобретения ими фенотипа дифференцированных тканевых Мф. Интересно, что добавление LPS и IFN γ снижало экспрессию коллагена типа VIII и увеличивали секрецию MMP-1 [180].

1.2.6. Поглощение деградированного матрикса с помощью рецепторов, расположенных на поверхности

Деградация коллагена может осуществляться несколькими путями, с помощью вне- или внутриклеточных механизмов. Внеклеточная деградация подразумевает разрезание коллагена под воздействием коллагенолитических протеаз (таких как MMP, катепсины и др.), тогда как внутриклеточная — расщепление коллагена и других белков ВКМ в лизосомальном компартменте после предварительной интернализации [185]. Известно, что многие клетки способны интернализировать коллаген, в т.ч. через специфические рецепторы (в частности, рецептор uPARAP/Endo180), ответственные за фагоцитоз коллагена β 1-интегрины, Mfge8 и маннозный рецептор [186]. Так, например, было показано, что фибронектиновый домен II типа маннозного рецептора проявляет выраженную специфичность к коллагену [187]. Данный домен имеет большую гомологию с таким же доменом uPARAP/Endo180. Позднее на мышинных Мф было показано, что указанные рецепторы участвуют в захвате и интернализации коллагена [187]. При этом в исследовании D.H. Madsen и соавт. было показано, что Мф поглощают коллаген не через uPARAP / Endo180, что характерно для

большинства клеточных подтипов, а через маннозный рецептор II (MR2 или CD206) [188]. Эти данные неоднократно подтверждались позднее [189, 190]. J. M. López-Guisa и соавт. показали, что у мышей, дефицитных по гену *Mrc2*, фиброз почек, вызванный односторонней обструкцией мочеточника, выражен значительно сильнее, чем у мышей дикого типа [191]. В более поздней работе D.H. Madsen и соавт. было продемонстрировано, что поглощение коллагена через маннозный рецептор осуществляется преимущественно минорной популяцией M2-подобных Мф, что подтверждает важное участие этого подтипа клеток в процессе фиброза [190].

1.2.7. Влияние на пролиферацию фибробластов

Сравнительный анализ влияния Мф с различными фенотипами на активность Фб показал, что Мф, поляризованные в присутствии IL-4 и дексаметазона эффективно стимулировали пролиферативный ответ Фб человека, в то время как поляризация IFN γ и LPS не сопровождалась увеличением пролиферации Фб, а, напротив, имела тенденцию к снижению [192].

Zhu с соавт. также показали более выраженный стимуляторный эффект Мф, поляризованных IL-4 и IL-13, по сравнению с Мф, поляризованными LPS и IFN γ . Однако значимые различия обнаруживались только через 144 ч. Более того, Мф с M1 фенотипом также стимулировали пролиферацию дермальных Фб, хотя и в меньшей степени по сравнению с M2 клетками [193].

Аналогичный эффект был обнаружен при обработке Фб растворимыми факторами Мф: КС M2 Мф активно стимулировали пролиферацию дермальных Фб через 144 ч, а КС M1 клеток не оказывали значимого влияния на пролиферативный ответ [194].

Растворимые факторы Мф (полученных из клеточной линии, циркулирующих моноцитов и альвеолярных Мф), поглотивших

апоптотические клетки, не оказывали значимого влияния на пролиферативный уровень Фб в смешанной культуре [195].

1.2.8. Влияние на дифференцировку фибробластов

Как уже было описано выше, тканевые Фб способны дифференцироваться в МиоФб под влиянием различных стимулов, включая ростовые факторы и цитокины. Известно, что Мф продуцируют такие факторы, как TGF- β , PDGF, IL-10 и др., благодаря чему, могут регулировать дифференцировку Фб в МиоФб. Однако имеющиеся в настоящий момент данные достаточно противоречивы.

Согласно данным исследования Zhu и соавт., совместное культивирование дермальных Фб с Мф различных фенотипов (M1 и M2) характеризуется разнонаправленным влиянием на экспрессию α -SMA: M1(LPS+IFN γ) ингибируют экспрессию данного маркера, в то время как M2(IL-4+IL-13), напротив, стимулируют (значимые различия возникают после 144 ч со-культивирования) [193]. Аналогичные результаты были получены в исследовании Glim и соавт., в котором обработка Фб растворимыми факторами Мф с M2 фенотипом приводила к более выраженной стимуляции экспрессии α -SMA по сравнению с M1 клетками. Интересно, что данный эффект наблюдался только для дермальных Фб, в то время как десневые Фб не демонстрировали значимых различий [104]. В свою очередь, Ploeger и соавт., напротив, не обнаружили влияния супернатантов M1(LPS+IFN γ) и M2(IL-4+IL-13) Мф на уровень экспрессии мРНК α -SMA [194].

С другой стороны, было показано, что КС Мф мыши, фенотип которых генерировался поглощением апоптотических клеток, наоборот, способствовала снижению экспрессии миофибробластных маркеров (α -SMA) в легочных фибробластах *in vitro* [196].

На мышях было показано, что M2 Мф в большей степени, чем M1, стимулируют дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в

МиоФб, и эти эффекты реализуются посредством Wnt/ β -catenin сигнального пути. В этом же исследовании было продемонстрировано наличие инфильтрации М2 Мф и активация Wnt/ β -catenin сигнального пути в образцах легких у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом [197].

Со-культивирование М2 Мф с МиоФб сопровождалось увеличением мРНК α -SMA и коллагена I, которые значительно уменьшались при обработке анти-TGF- β и анти-IL-4 антителами [198].

При совместном культивировании орбитальных Фб и Мф, полученных из линии U-937 и дифференцированных РМА (т.е. провоспалительным стимулом), увеличивалась продукция гиалуроновой кислоты фибробластами, а сами орбитальные Фб приобретали сократительный фенотип [199].

1.2.9. Влияние на продукцию фибробластами ВКМ

Ранее F. Ullm с соавт. показали, что экспрессия гена α цепи коллагена I Col 1a1 коррелировала с уровнем продукции IL-10 M-CSF-дифференцированными неполяризованными Мф [169].

В свою очередь, Zhu с соавт. продемонстрировали, что со-культивирование дермальных Фб с М1 Мф ингибировало продукцию коллагена, тогда как М2 клетки, напротив, стимулировали его продукцию. Более того, было показано, что экспрессия мРНК α 1 цепи коллагена I типа также ингибировалась М1 Мф, и стимулировалась М2 Мф [193].

Напротив, Ploeger с соавт. продемонстрировали, что кондиционные среды (КС) М2 Мф не способствовала увеличению уровня экспрессии мРНК α 1 цепи коллагена I типа Фб, в то время как М1 Мф, как и в работе Zhu, ингибировали синтез ВКМ [194].

Мф, генерируемые из моноцитов периферической крови, после поглощения апоптотических клеток стимулировали продукцию коллагена Фб [195]. С другой стороны, на мышинных Фб был показан обратный эффект: фагоцитоз апоптотических клеток Мф приводил к формированию фенотипа Мф, КС которых подавляла экспрессию мРНК Col1

и фибронектина в легочных Фб, активированных TGF- β [196]. Тем не менее, в работе Wang и соавт., напротив, были продемонстрированы фибротические эффекты действия апоптотических клеток в модели фиброза [200]. Таким образом, имеющиеся в настоящий момент данные указывают на то, что Мф имеют ключевое значение для регуляции фиброгенеза, реализуя свои эффекты посредством ряда механизмов. При этом большинство полученных данных свидетельствует о провоспалительном и антифиброгенном потенциале Мф с M1 фенотипом (индуцированных IFN γ и/или LPS) и профиброгенной активности M2a (индуцированных IL-4/IL-13). Тем не менее, полученные данные во многом противоречивы, а участие других подтипов Мф человека в регуляции фиброгенеза остается недостаточно изученным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Генерация макрофагов

В исследование были включены условно здоровые доноры обоего пола 21-54 лет. Забор крови и все исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) (20 минут, 3000 об/мин) с последующим двукратным отмыванием клеток забуфференным физиологическим раствором (ЗФР) и далее культивировали в количестве $4-5 \times 10^6$ /мл в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 (БиолоТ, Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF или GM-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. На 5-ый день в культуры добавляли соответствующие поляризующие стимулы: 10 мкг/мл LPS (E.coli 0114:B4, Sigma-Aldrich, США) или 200 МЕ/мл IFN γ (Фармаклон, Россия) – для получения M1, 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США) – для M2a, 50 нг/мл дексаметазона (Dex) (KRKA, Словения) – для M2c. Для получения M2(LS, Low Serum) использовали аналогичную среду, дополненную GM-CSF (50 нг/мл) и 2% аутоплазмы (условия дефицита ростовых/сывороточных факторов); при этом время адгезии увеличивали до 18 часов, что необходимо и достаточно для индукции апоптоза во фракции неадгезивных МНК и поглощения апоптотических клеток моноцитами. Общая схема получения Мф отражена на Рисунке 2.1. По окончании срока культивирования (7 дней) Мф получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали

количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). Супернатанты собирали, центрифугировали, подвергали стерилизующей фильтрации, криоконсервировали и хранили при температуре -80°C . Все подтипы Мф были получены от одних и тех же доноров, что позволяло сравнить между собой Мф различных функциональных фенотипов, полученных от одного индивида.

В отдельной серии экспериментов для анализа концентрации цитокинов 7-дневные М- и GM-CSF-дифференцированные M1($\text{IFN}\gamma$), M2a(IL-4), M2c(Dex) и M2(LS) помещали в 96-луночный планшет в количестве 50×10^3 клеток/лунку и культивировали в течение дополнительных 24 ч в присутствии/отсутствии 10 мкг/мл LPS (*E.coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, США). По завершении культивирования супернатанты центрифугировали, криоконсервировали и хранили при температуре -80°C .

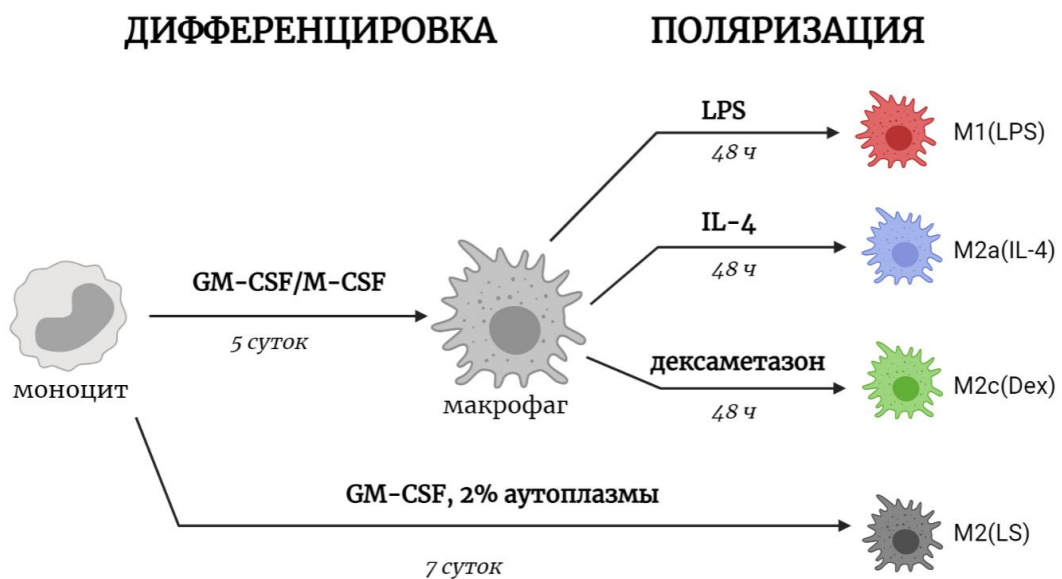


Рисунок 2.1 – Схема генерации макрофагов.

2.2. Линия фибробластов

Источником Фб служили линия Фб кожно-мышечной ткани эмбриона человека ФЭЧ-16-2 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и линия дермальных Фб ожогового больного NAF1, которая была любезно

предоставлена ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Для исследования функциональной активности Фб (дифференцировки в МиоФб и продукции коллагена) клетки линии NAF1 культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в кондиционной среде (КС) Мф в течение 24 ч, а затем однократно отмывали ЗФР и продолжали культивировать в бессывороточной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) в течение 3-5 дней.

2.3. Аллостимуляторная активность

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

2.4. Пролиферация фибробластов

Пролиферативный ответ клеток линии ФЭЧ-16-2 и NAF1 определяли радиометрическим методом. Для этого Фб культивировали в 96-луночной планшете (TPP, Швейцария) в концентрации 5×10^3 клеток/лунку в КС различных функциональных фенотипов Мф или среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) (спонтанная пролиферация) в течение 24 ч, затем КС удаляли, клетки однократно отмывали и продолжали культивирование в среде DMEM/F12 до

5 суток. Пролиферацию Фб оценивали по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивирования (1 мкКю/ лунку). Индекс стимуляции пролиферации Фб рассчитывали как отношение пролиферативного ответа Фб, обработанных КС различных подтипов Мф, к уровню спонтанной пролиферации (отрицательный контроль).

2.5. Иммуноферментный анализ

Концентрацию цитокинов и хемокинов оценивали в супернатантах исследуемых подтипов Мф при помощи производственных тест-систем Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp I Panel 8- и 17-Plex (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Уровень продукции VEGF, IGF-1, TGF- β 1, MMP-9, TIMP-1, и катепсина L в супернатантах 7-дневных культур Мф оценивали с помощью иммуноферментного анализа. Для определения концентрации VEGF, IGF-1, TGF- β 1, MMP-9 и TIMP-1 использовали соответствующие ELISA kit (все наборы R&D System, США) в соответствии с инструкцией производителя. Перед анализом концентрации TGF- β 1 латентную форму фактора предварительно активировали в исследуемых образцах в соответствии с руководством.

Для определения уровня продукции катепсина L использовали Human Cathepsin L Platinum ELISA (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Уровень продукции коллагена I типа определяли в 7-суточных супернатантах Мф и супернатантах фибробластов, обработанных КС Мф, по концентрации α 1-цепи коллагена I типа с помощью Human COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1) ELISA Kit (FineTest, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Для Мф анализируемую концентрацию коллагена пересчитывали на 1 млн клеток, для Фб – на 100 тыс. клеток.

2.6. Проточная цитометрия

Приготовление образцов для определения относительного содержания Мф, экспрессирующих поверхностные CD-маркеры, проводили в соответствии с методикой Becton Dickinson. Мф (50 мкл, $0,5 \times 10^6$ клеток/пробу) в растворе «А» (5% желатиноля, 0,1% азида натрия, 0,02% ЭДТА, 10% сыворотки доноров АВ(IV) группы в фосфат-забуференном физиологическом растворе) помещали в пробирки. К суспензии клеток добавляли по 5 мкл моноклональных анти-CD14-FITC, -CD86-FITC, -HLA-DR-PerCP, -CD206-PE, -CD163-PerCP, -MerTK-AlexaFluor647 антител (BD PharMingen, США) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки отмывали от антител путем добавления в каждую лунку 2,5 мл раствора «А» и центрифугирования при 1000 об/мин (300g) 5 мин, после чего надосадочную жидкость сливали. Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора «А» и переносили в пробирки для цитофлуориметрического анализа, содержащие 0,4 мл фиксирующего раствора (FACS Lyse, Becton Dickinson, США), что обеспечивало фиксацию с полным разрушением остаточных эритроцитов.

Подготовленные таким образом пробы подвергали исследованию на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США) и определяли процент позитивных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры.

Степень дифференцировки дермальных Фб линии NAF1 в МиоФб оценивали по уровню внутриклеточной экспрессии альфа-гладкомышечного актина α -SMA. С этой целью Фб после отмывки раствором «А» пермеабилизировали с помощью 0,2% раствора Твин-20 (Transcription Factor Buffer Set, BD PharMingen, США) и далее инкубировали их в течение 30 мин при комнатной температуре с 5 мкл моноклональными анти- α -SMA антителами, конъюгированными с алофикоцианином (APC) (R&D Systems, США). Затем клетки ресуспендировали в 50 мкл раствора «А» и переносили

в пробирки для цитофлуориметрического анализа, содержащие 0,4 мл фиксирующего раствора. В качестве позитивного контроля использовали TGF- β 1-индуцированный уровень экспрессии α -SMA (PeproTECH, США). Негативным контролем служила спонтанная дифференцировка Фб в МиоФб в бессывороточной среде.

Подготовленные таким способом пробы подвергали исследованию на сортире-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest, оценивали процент позитивных клеток, экспрессирующих α -SMA.

2.7. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов производили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием возможностей программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., USA). Данные представлены в виде медиан с указанием интерквартильных диапазонов (Me, IQR) и минимума-максимума. Значимость различий сравниваемых групп оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок; различия считались значимыми при $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристика макрофагов

3.1.1. Морфологическая характеристика макрофагов

Пластичность Мф является одной из важнейших особенностей данных клеток. В настоящий момент не существует единого протокола для генерации M1, M2a, M2c, M2d Мф *in vitro* – с этой целью используют различные дифференцировочные и поляризующие сигналы, варьируют дозы и время добавления стимулов. Учитывая вышеизложенное, первоначально необходимо было охарактеризовать культуры получаемых нами функциональных фенотипов Мф. Прежде всего, была проведена морфологическая характеристика Мф.

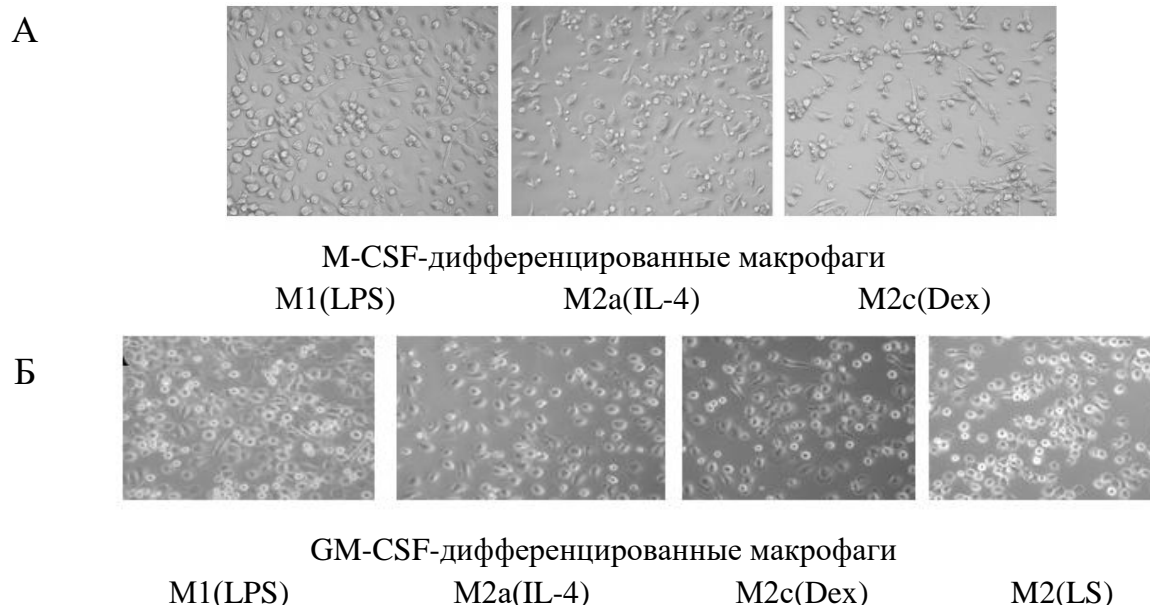


Рисунок 3.1.1 – 7-дневные культуры М-CSF- (А) и GM-CSF- (Б) дифференцированных Мф, нативные препараты, увеличение x250. Представлены данные репрезентативного эксперимента.

В культурах М-CSF-дифференцированных Мф обращало на себя внимание присутствие большого количества клеток с фибробластоподобной

морфологией. Подобная картина наблюдалась во всех исследуемых культурах Мф (Рисунок 3.1.1 А). Напротив, GM-CSF-дифференцированные Мф, включая M1 (LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex), содержали клетки округлой формы и отличались небольшим количеством фибробластоподобных клеток. При этом все исследуемые культуры, вне зависимости от используемого поляризующего стимула, не различались между собой (Рисунок 3.1.1 Б).

3.1.2. Фенотипическая характеристика макрофагов

Поскольку наиболее общепринятым, хотя и не лишенным недостатков подходом к характеристике Мф является определение поверхностных и внутриклеточных маркеров, на следующем этапе полученные функциональные фенотипы Мф характеризовали по уровню экспрессии CD14, CD206, CD163, CD86, HLA-DR, тирозин-киназы MER (MerTK). В культурах M-CSF-дифференцированных Мф большая часть клеток экспрессировала CD14, в то же время HLA-DR выявлялся не более чем у 40% Мф (Рисунок 3.1.2.1 А, В). В свою очередь, GM-CSF-дифференцированные Мф отличались в целом значимо большим уровнем HLA-DR⁺ и CD206⁺ клеток по сравнению с M-CSF-индуцированными аналогами (Рисунок 3.1.2.2 В, Г).

Одним из характерных признаков M1(LPS) является экспрессия CD86, однако в культурах M-CSF-дифференцированных Мф при стимуляции LPS доля CD86⁺ клеток не превышала 10% (Рисунок 3.1.2.1 Б). Тем не менее, данный показатель был выше, по сравнению с M2 клетками. Что касается M2-ассоциированных маркеров (CD206, CD163 и MerTK), значимого влияния поляризующего стимула на экспрессию CD206 обнаружено не было (Рисунок 3.1.2.1 Г). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) превышали M1(LPS) по уровню CD163⁺ и MerTK⁺ клеток ($p < 0,05$), причем максимальное значение было характерно M2c(Dex) (Рисунок 3.1.2.1 Д, Е).

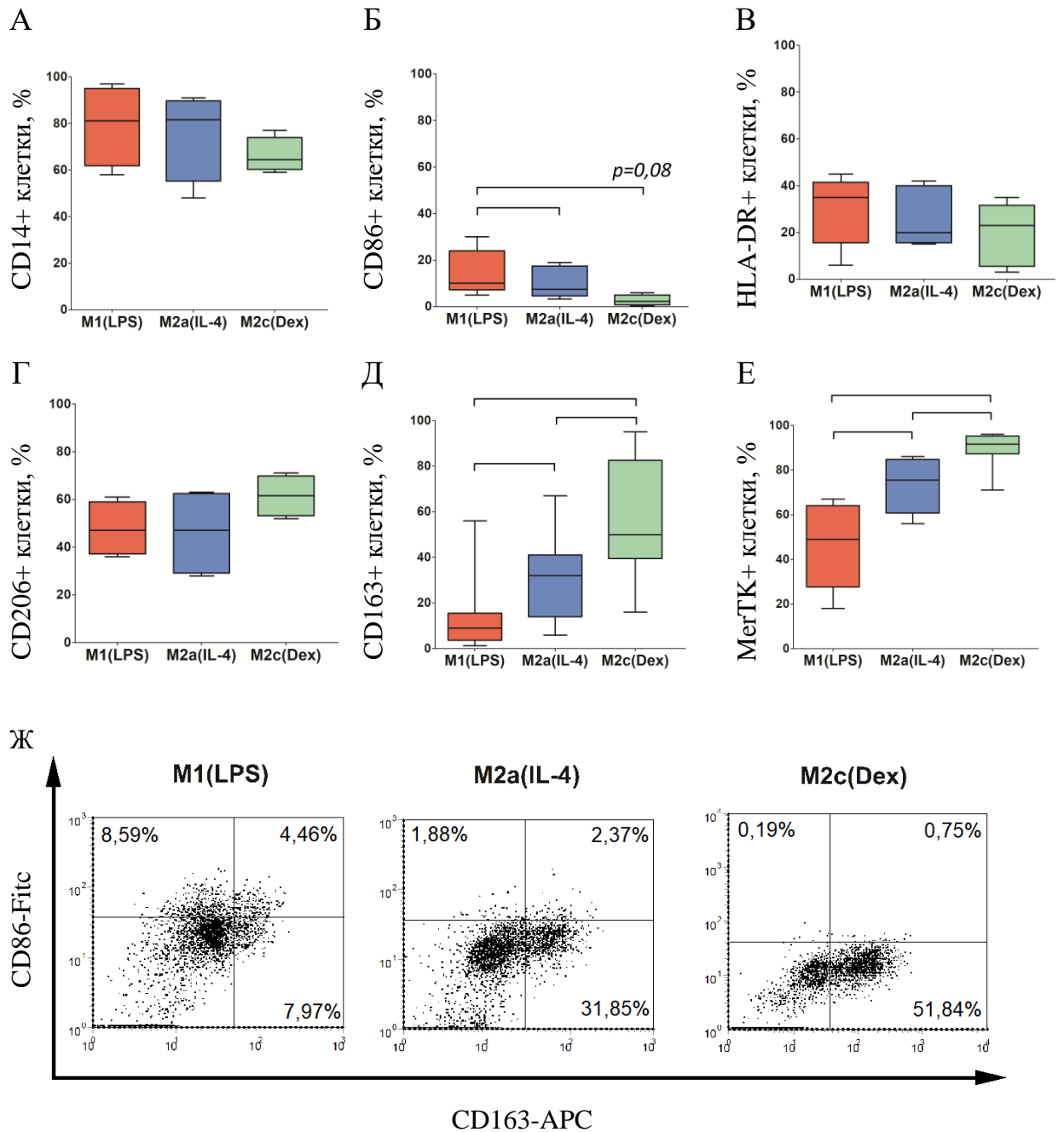


Рисунок 3.1.2.1 – Относительное содержание (%) CD14+ (А), CD86+ (Б), HLA-DR+ (В), CD206+ (Г), CD163+ (Д) и MerTK+ (Е) Мф в М-CSF-дифференцированных культурах, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, $n = 4-9$, критерий значимости $p < 0,05$. (Ж) Относительное содержание CD86+ и CD163+ клеток (%) в М-CSF-дифференцированных культурах, цитометрические данные репрезентативного эксперимента.

Культуры GM-CSF-дифференцированных M1(LPS) характеризовались более высоким содержанием CD86+ клеток (от 25 до 60%) по сравнению с М-CSF-дифференцированными M1(LPS) (Рисунок 3.1.2.2 Б). Данный

показатель также значимо превышал уровень экспрессии этого маркера в сравнении с другими поляризующими стимулами (IL-4, дексаметазон и взаимодействие с апоптотическими клетками), что подтверждало формирование M1 фенотипа.

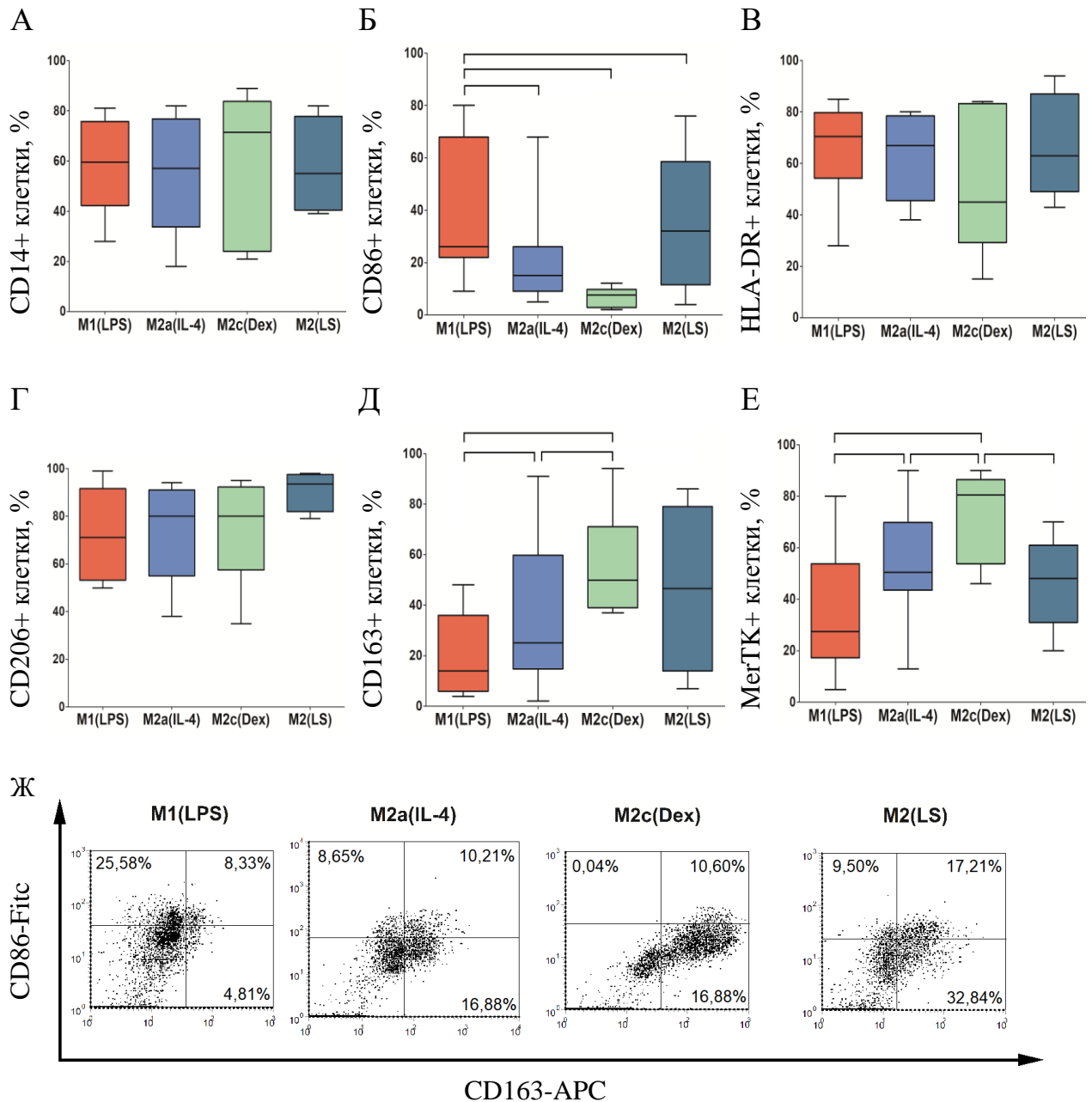


Рисунок 3.1.2.2 – Относительное содержание (%) CD14+ (А), CD86+ (Б), HLA-DR+ (В), CD206+ (Г), CD163+ (Д) и MerTK+ (Е) Мф в GM-CSF-дифференцированных культурах, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n = 4–12, критерий значимости p<0,05. (Ж) Относительное содержание CD86 и CD163+ клеток (%) в GM-CSF-дифференцированных культурах, цитометрические данные репрезентативного эксперимента.

Подобно тому, как это было показано для M-CSF-дифференцированных Мф, не было обнаружено влияния поляризирующего стимула на экспрессию CD206 (Рисунок 3.1.2.2 Г). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) значимо превышали M1(LPS) по экспрессии CD163 и MerTK, причем максимально высокое содержание CD163⁺ и MerTK⁺ клеток было характерно для M2c(Dex) (Рисунок 3.1.2.1 Д, Е). Что касается M2(LS), то они отличались от других M2 Мф достаточно высоким уровнем CD86, который тем не менее значимо не отличался от других M2 Мф, и в то же время был значимо ниже такового M1(LPS). При этом M2(LS) как и другие M2 клетки, активно экспрессировали CD163 и MerTK (Рисунок 3.1.2.2 Б, Д, Е).

3.1.3. Продукция цитокинов и хемокинов

Мф характеризуются широким спектром продуцируемых цитокинов и хемокинов, которые играют важную роль в поддержании гомеостаза, развитии и подавлении воспалительной реакции, процессе репарации ткани. Поскольку секреция цитокинов и хемокинов является одним из важных параметров характеристики функционального фенотипа Мф, нами был проведен анализ спонтанной и LPS-индуцированной продукции 14 цитокинов (IL-1 β , IL-2, -4, -5, -6, -7, -10, -12p40, -13, -17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , TNF α) и 3 хемокинов (IL-8, MCP-1 и MIP-1 β) различными культурами Мф (Рисунок 3.1.3). Результаты показали, что культуры Мф (как M-CFS, так и GM-CSF-дифференцированные) характеризовались высокой концентрацией IL-8 и MCP-1, в то время как содержание IL-7 и IL-13, напротив, было очень низким. IL-12p40 продуцировали преимущественно LPS-стимулированные GM-CSF-дифференцированные культуры, в то время как супернатанты нестимулированных и стимулированных LPS M-CSF-дифференцированных Мф характеризовались низким уровнем IL-12p40. Стимуляция LPS приводила к увеличению продукции большинства цитокинов, за исключением IL-7, IL-8, IL-13, MCP-1 и G-CSF для культур, дифференцированных в присутствии M-CSF.

GM-CSF-дифференцированные культуры характеризовались более высоким содержанием IL-1 β , MIP-1 β и TNF α по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами. Кроме того, при стимуляции LPS, GM-CSF-дифференцированные Мф отличались значимо большим уровнем IL-2, -4, -5, -6, -17 и G-CSF по сравнению с Мф, индуцированными GM-CSF.

Среди M-CSF-дифференцированных клеток наблюдались незначительные отличия между M1(IFN γ) и M2a(IL-4) и M2c(Dex) клетками. Так, супернатанты M1(IFN γ) отличались значимо более высоким содержанием IL-1 β , IL-2, IL-6, а также MIP-1 β (LPS-стимулированные культуры) и IFN γ на уровне тренда ($p=0,07$). В то же время, секретом M2a(IL-4) и M2c(Dex) был еще более схожим, т.к. значимые различия обнаруживались только в уровне продукции IL-4 (5,4 пг/мл и 2,95 пг/мл соответственно) и TNF α (3054 пг/мл и 1717,5 пг/мл соответственно) среди LPS-стимулированных клеток. Содержание других исследуемых цитокинов значимо не отличалось.

Среди GM-CSF-дифференцированных Мф культуры M1(IFN γ) характеризовались значимо большей концентрацией IL-1 β , IL-2, IL-5 (за исключением LPS-стимулированных M2c(Dex)), IFN γ , MIP-1 β , TNF α по сравнению с клетками с M2 фенотипом. В то же время, концентрация IL-4 (нестимулированные Мф) и IL-10 (LPS-стимулированные культуры) была меньше, по сравнению с таковым для M2 клеток, за исключением M2(LS). Кроме того, нестимулированные M1(IFN γ) Мф отличались значимо большим уровнем IL-6 и GM-CSF по сравнению с M2a(IL-4) и M2c(Dex), однако эти различия пропадали после стимуляции LPS. Между собой GM-CSF-дифференцированные M2a(IL-4) и M2c(Dex) Мф практически не отличались по спектру продуцируемых цитокинов; значимые различия обнаруживались лишь в продукции IFN γ в нестимулированных культурах. В свою очередь, M2(LS) характеризовались уникальным цитокиновым профилем и отличались от других M2 фенотипов меньшей продукцией IL-1 β , но более активной IL-7, IL-13, IL-17. В отсутствие LPS-сигнала M2(LS)

характеризовались значимо большим содержанием IL-6, IL-10 и IL-12p40 по сравнению с другими M2 клетками, а стимулированные M2(LS) отличались более низким уровнем IL-2, IL-5, IL-8 и TNF α , но более высоким G-CSF и IFN γ .

Таким образом, M1 Мф отличались более высоким содержанием провоспалительных цитокинов, уровень которых в большинстве случаев увеличивался при стимуляции LPS. M2a(IL-4) и M2c(Dex) в целом характеризовались схожим цитокиновым профилем с более низким содержанием провоспалительных цитокинов по сравнению с M1 клетками и не различались существенно между собой. Цитокин-секреторная активность M2(LS) отличалась как от M1, так и от других типов M2.

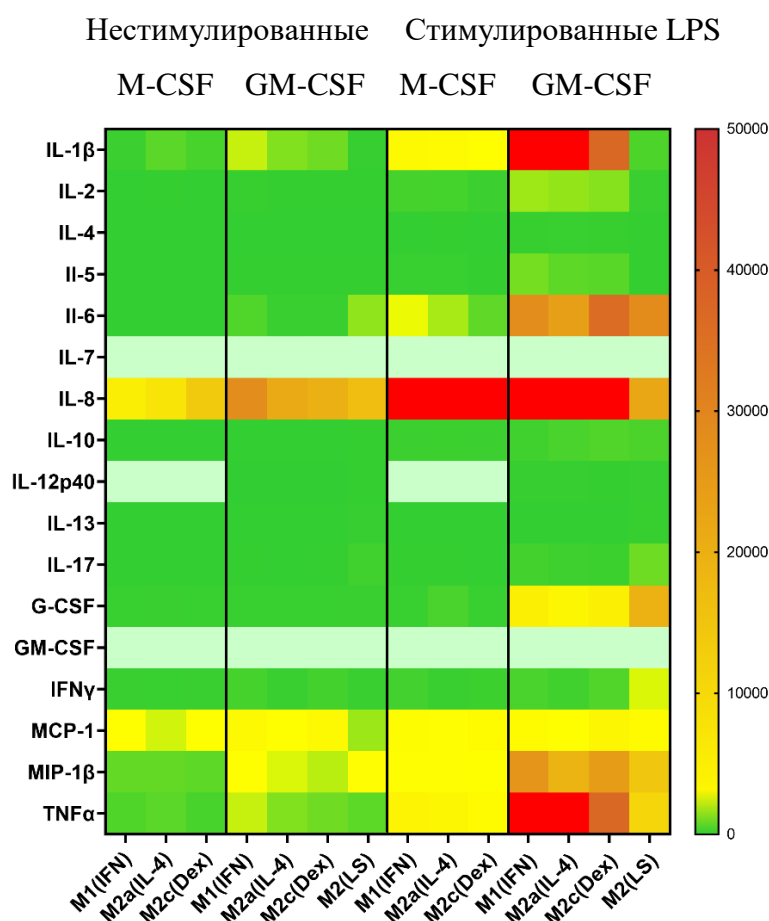


Рисунок 3.1.3 – Содержание цитокинов (пг/мл) в М- и GM-CSF-дифференцированных культурах (спонтанная продукция и стимулированная LPS). Данные представлены в виде тепловой карты медианных значений, $n = 6-10$.

3.1.4. Аллостимуляторная активность макрофагов

Определение экспрессии поверхностных маркеров, уровня продукции различных цитокинов и особенностей метаболизма у мышей позволяет точно дифференцировать M1 и M2 функциональные фенотипы Мф, однако у человека экспрессия аргиназы и IL-10 не является универсальными параметрами M2 Мф. Поскольку в настоящий момент не существует специфических маркеров, с помощью которых можно было бы точно идентифицировать различные подтипы Мф человека, в качестве метода оценки функционального фенотипа Мф нами было решено использовать аллостимуляторную активность – способность Мф стимулировать пролиферацию аллогенных Т клеток в смешанной культуре лейкоцитов (СКЛ). Она представляет собой интегральный показатель, детерминированный рядом параметров, включая уровень экспрессии HLA-DR антигенов, костимуляторных и коингибиторных молекул, продукцией цитокинов, способностью индуцировать Т регуляторные клетки. В литературе имеются единичные сообщения о высокой аллостимуляторной активности M1 клеток. Нами также ранее показано, что M2 Мф, генерируемые в условиях дефицита ростовых факторов, обладают низкой аллостимуляторной активностью. Однако сравнительных исследований аллостимуляторной активности различных функциональных фенотипов Мф человека ранее не проводилось.

Анализ аллостимуляторной активности Мф показал, что все исследуемые типы Мф оказывали стимулирующее действие на пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ (Рисунок 3.1.4.1 А и Б). При этом дифференцировка Мф в присутствии GM-CSF приводила к формированию Мф с более выраженной аллостимуляторной активностью, что особенно было характерно для M1(LPS). Так, по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами, данные клетки характеризовались значимо более высокими индексами стимуляции (9,3 vs 5,0; $p=0,0009$). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) характеризовались одинаково низкой

аллостимуляторной активностью не зависимо от типа дифференцировочного фактора ($p>0,1$).

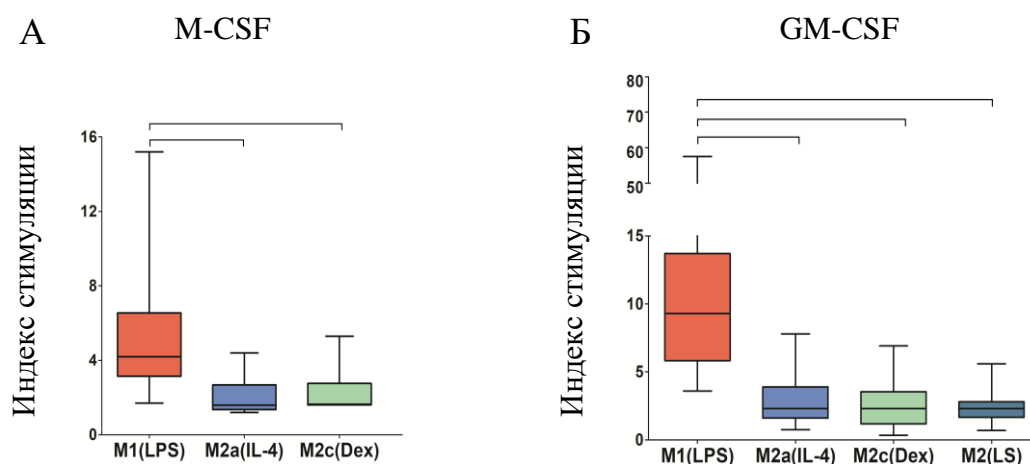


Рисунок 3.1.4.1 – Аллостимуляторная активность Мφ, дифференцированных М-CSF (А, $n=7-10$) и GM-CSF (Б, $n=15-41$). Данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, $p<0,05$.

Среди М-CSF-дифференцированных культур максимально высокой аллостимуляторной активностью обладали М1(LPS). ИС данных клеток составлял 5,0, в то время как М2а(IL-4) и М2с(Dex) усиливали пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов всего в 1,97 и 2,16 раза соответственно. Клетки с М2 фенотипом не различались между собой по уровню аллостимуляторной активности (Рисунок 3.1.4.1 А).

Среди GM-CSF-индуцированных Мφ наиболее выраженный стимулирующий эффект проявляли М1 Мφ, стимулированные LPS. ИС данных клеток варьировал от 3,6 до 57,5, значимо превышая значения М2а(IL-4) и М2с(Dex). В свою очередь, М2а(IL-4) и М2с(Dex) увеличивали пролиферативный ответ Т клеток в алло-СКЛ в 2,3 раза. М2(LS), как и другие клетки с М2 фенотипом, отличались невысокими значениями ИС (2,3 расч. ед) по сравнению с М1(LPS) ($p=0,0006$) и не отличались от М2а(IL-4) и М2с(Dex) (Рисунок 3.1.4.1 Б).

Полученные данные явились основанием для проведения анализа операционных характеристик теста для идентификации фенотипа Мφ,

основанного на определении аллостимуляторной активности Мф (ИС) в СКЛ. На Рисунке 3.1.4.2 представлена характеристическая кривая (receiver-operator curve, ROC), иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции М1 и М2 (М2а(IL-4) и М2с(Dex)), поляризованных из М-CSF-дифференцированных клеток, в алло-СКЛ. ROC-анализ операционных характеристик теста и построенная характеристическая ROC-кривая показали, что площадь под кривой (AUC) для данного теста составила 0.89 (95% ДИ 0,79–0,99, $p < 0,0001$), что свидетельствует об очень хорошей прогностической значимости теста. Определение чувствительности, специфичности и отношения правдоподобия для различных точек разделения показало, что для ИС в алло-СКЛ М1 и М2 М-CSF-дифференцированных Мф точкой разделения, соответствующей максимальным показателям чувствительности (81%) и специфичности (89%), являлось пороговое значение $< 2,95$ расч. ед. (отношение правдоподобия 7,3).

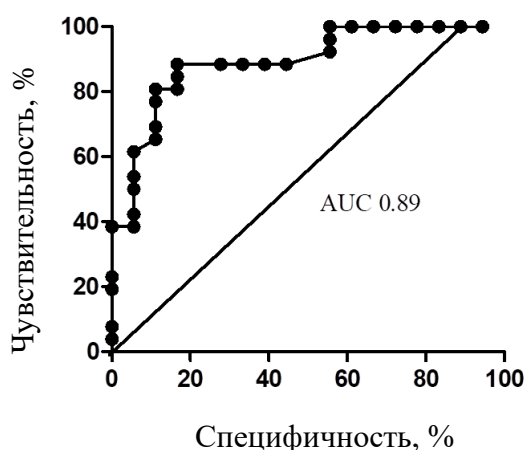


Рисунок 3.1.4.2 – ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции М1 и М2(а+с) М-CSF-дифференцированных Мф в СКЛ.

Аналогичный анализ был выполнен для GM-CSF-дифференцированных культур Мф (Рисунок 3.1.4.3). ROC-анализ операционных характеристик теста и построенная характеристическая ROC-

кривая показали, что площадь под кривой (AUC) для данного теста составила 0.96 (95% ДИ 0,92–0,99, $p < 0,0001$), что свидетельствует об отличной прогностической значимости. Определение чувствительности, специфичности и отношения правдоподобия для различных точек разделения показало, что для ИС в алло-СКЛ GM-CSF-дифференцированных M1 и M2 Мф точкой разделения, соответствующей максимальным показателям чувствительности (80,4%) и специфичности (91%) являлось пороговое значение $< 3,7$ расч. ед. (отношение правдоподобия 9,04).

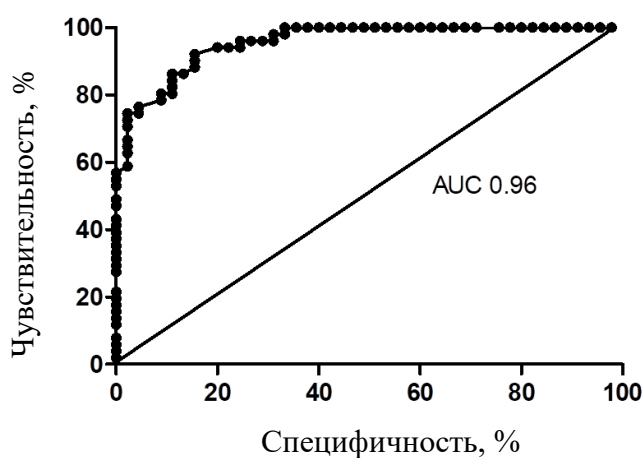


Рисунок 3.1.4.3 – ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции M1 и M2(a, c, LS) GM-CSF-дифференцированных Мф в СКЛ.

Таким образом, оценка аллостимуляторной активности может являться эффективным методом идентификации Мф человека с оппозитными M1 или M2 функциональными фенотипами, который отличается высокой диагностической точностью (специфичность на уровне 89-91% и чувствительность на уровне 80-81%), а также универсальностью подхода, поскольку позволяет идентифицировать поляризованные различными стимулами M1 и M2 Мф.

Поскольку данный метод является простым и удобным для определения «качества» получаемых культур Мф с M1 и M2 фенотипом, далее именно его использовали для контроля генерируемых клеток.

3.2. Фиброгенная активность макрофагов

Регуляторная роль Мф в фибротических процессах была широко показана в экспериментальных моделях фиброза легких, печени, почек, кожи, а также при репарации кожных ран. Однако в отношении Мф человека существует ограниченное количество исследований. Более того, все они ограничены только М1 и М2а подтипами Мф, в то время как клетки с М2с фенотипом, которым, как предполагают, присуща антифиброгенная активность, изучены недостаточно. Кроме того, поскольку важной частью разрешения воспаления и репарации является фагоцитарный клиренс апоптотических клеток, нас также интересовала популяция М2(LS) Мф, получаемых в условиях дефицита ростовых/сывороточных факторов.

Известно, что Мф способны принимать участие в фиброгенезе, влияя непосредственно на белки ВКМ, или оказывая регулирующее воздействие на функциональную активность клеток-продуцентов ВКМ и, в первую очередь, Фб, поэтому в данной работе исследовали не только влияние Мф на Фб, но и оценивали способность различных функциональных фенотипов Мф продуцировать коллаген, а также протеазы, способствующие деградации ВКМ. Первоначально анализировали свойства Мф дифференцируемых под влиянием М-CSF состоянии, т.е. в условиях, моделирующих *in vitro* «steady-state» Мф, а далее исследовали Мф, генерируемые в условиях, моделирующих *in vitro* воспаление (GM-CSF-дифференцированные Мф).

3.2.1. Прямое влияние М-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ

Продукция коллагена

Ранее было показано, что Мф человека способны не только регулировать активность коллаген-продуцирующих клеток, но и самостоятельно секретировать компоненты ВКМ. Однако продуцируют ли Мф человека коллаген I типа и отличаются ли различные подтипы по уровню его продукции, неизвестно. Поскольку среди всего семейства коллагенов

именно коллаген I типа является основополагающим при развитии фибротических процессов во взрослом организме, следующий этап работы был посвящен исследованию его продукции Мф человека. Результаты оценки концентрации коллагена в супернатантах культур Мф показали, что все исследуемые подтипы продуцировали коллаген I типа на хорошо детектируемом уровне (Рисунок 3.2.1.1).

Культуры M1(LPS), дифференцированные в присутствии M-CSF, отличались несколько более низким содержанием коллагена I по сравнению с M2 фенотипом (M2a(IL-4) и M2c(Dex)) (3346 пг/мл, 4711 пг/мл и 5029 пг/мл соответственно), хотя различия не были статистически значимыми. Клетки с M2 фенотипом характеризовались одинаковым уровнем продукции коллагена I вне зависимости от поляризирующего стимула.

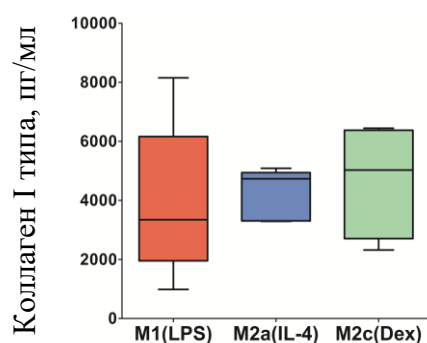


Рисунок 3.2.1.1 – Продукция коллагена I типа M-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=6.

Продукция MMP и TIMP

Известно, что Мф способны принимать участие в регуляции процесса синтеза/деградации ВКМ, продуцируя некоторые MMP, включая MMP-1, -2, -7, -8, -9, -12, -14, а также их эндогенные супрессоры, TIMP. Нами была произведена оценка уровня продукции макрофагами матричных металлопротеиназ на примере MMP-9, как наиболее важной протеазы, продуцируемой Мф и участвующей в фиброзе, и их тканевых ингибиторов на примере TIMP-1.

На Рисунке 3.2.1.2 представлены данные, характеризующие концентрацию MMP-9 и TIMP-1, а также отношение MMP-9/TIMP-1 в 7-дневных супернатантах культур М-CSF-дифференцированных Мф. М1(LPS) характеризовались более низкой MMP-продуцирующей активностью по сравнению с М2 клетками. В свою очередь, среди клеток с М2 фенотипом наибольшее содержание MMP-9 обнаруживалось в супернатантах М2а(IL-4) (9138 пг/мл). Тем не менее, значимых различий между исследуемыми функциональными фенотипами выявлено не было (Рисунок 3.2.1.2 А).

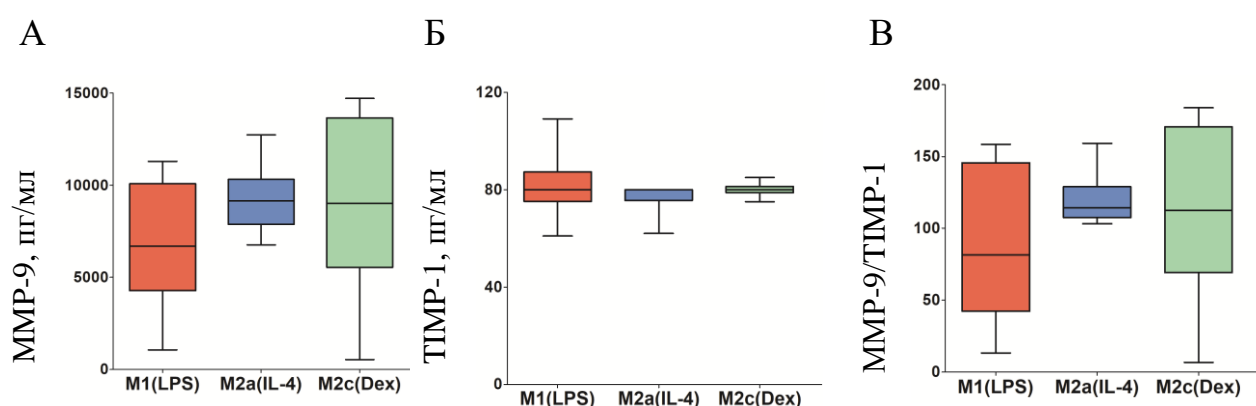


Рисунок 3.2.1.2 – Продукция MMP-9 (А) и TIMP-1 (Б) и индексы соотношения MMP-9/TIMP-1 (В) для М-CSF-дифференцированных Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=6.

Что касается TIMP-1, то дифференцировка Мф в присутствии М-CSF приводила к генерации Мф, которые слабо продуцировали TIMP-1 (а нижнем уровне чувствительности метода, <80 пг/мл) (Рисунок 3.2.1.2 Б).

Поскольку в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани важную роль играет баланс MMP и TIMP, далее было проанализировано значение соотношений MMP-9/TIMP-1. Так как М-CSF-дифференцированные Мф отличались низкой TIMP-1-продуцирующей активностью, для всех исследуемых функциональных фенотипов был характерен максимально высокий индекс соотношения MMP-9/TIMP-1 (Рисунок 3.2.1.2 В).

Производство катепсина

Одной из протеаз, субстратом для которой является ВКМ и которая активно продуцируется макрофагами, является катепсин L. Тем не менее, сравнительный анализ продукции катепсина L различными функциональными фенотипами Мф ранее не проводился. В связи с этим была произведена оценка уровня секреции этой протеазы в супернатантах М-CSF-дифференцированных Мф. Из Рисунка 3.2.1.3 видно, что Мф продуцировали катепсин L на относительно одинаковом уровне вне зависимости от поляризующего стимула. Так, М-CSF-дифференцированные M1(LPS) не отличались значимо от M2a(IL-4) и M2c(Dex), хотя концентрация в супернатантах M2c(Dex) была несколько выше по сравнению с остальными подтипами (2349,1 пг/мл vs 1646,2 и 1513 пг/мл соответственно).

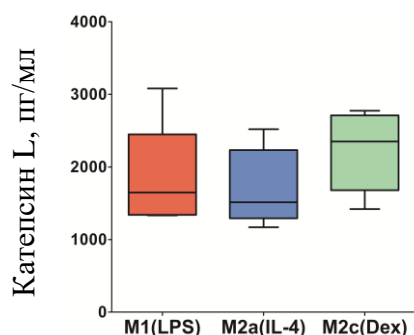


Рисунок 3.2.1.3 – Производство катепсина L М-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=5.

3.2.2. Опосредованное влияние М-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ

Влияние на пролиферативный ответ фибробластов

Поскольку в основе развития фиброза важная роль отводится Фб, далее было проанализировано влияние растворимых факторов различных фенотипов Мф на рост и функциональную активность Фб.

Известно, что фиброгенез во время внутриутробного развития имеет ряд отличий от процесса, происходящего во взрослом организме, одним из

которых является заживление повреждения у плода на ранних сроках гестации без гистологических признаков образования рубцовой ткани. Учитывая эти данные, анализ эффектов Мф на пролиферативную активность Фб был проведен с использованием Фб двух типов – эмбриональных (кожно-мышечной ткани эмбриона) и постэмбриональных (Фб дермы взрослого).

Из Рисунка 3.2.2.1 А видно, что КС Мф в «steady-state» состоянии практически не влияли на пролиферативный ответ эмбриональных Фб; ИС M1(LPS) составлял 1,175, M2a(IL-4) – 1,165 и M2c(Dex) – 1,075. При этом функциональные фенотипы Мф не отличались по своему стимулирующему эффекту.

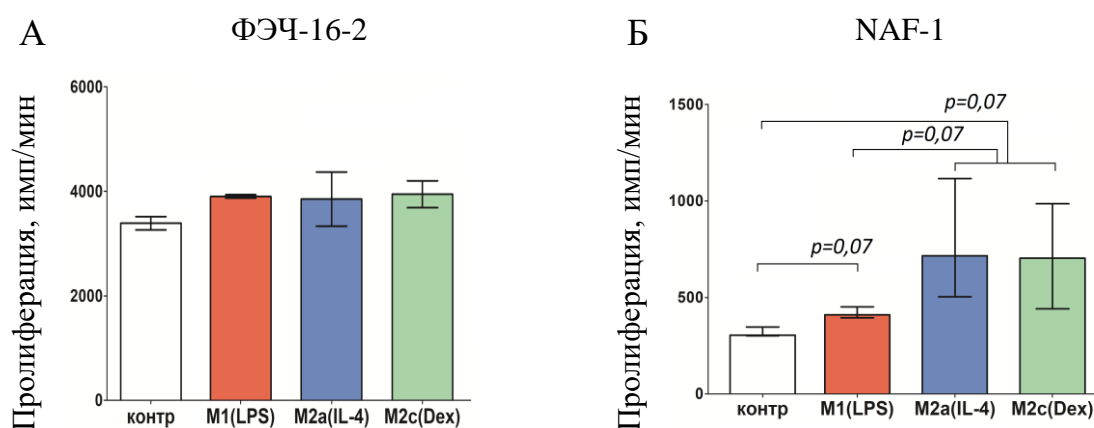


Рисунок 3.2.2.1 – Пролиферативный ответ эмбриональных (А) и дермальных (Б) Фб в присутствии КС М-CSF-дифференцированных Мф, данные представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона, n=2–4.

Поскольку Мф не проявляли стимулирующих свойств по отношению к эмбриональным Фб, далее мы сконцентрировали свое внимание на исследовании влияния КС Мф на пролиферацию Фб взрослого человека (на примере дермальных Фб линии NAF1) (Рисунок 3.2.2.1 Б). Следует отметить, что сравнительный анализ пролиферативного ответа эмбриональных и постэмбриональных Фб, культивированных в присутствии КС Мф, продемонстрировал, что все исследуемые фенотипы Мф стимулировали пролиферацию дермальных Фб взрослого NAF1, в отличие от ФЭЧ-16-2. По-

видимому, более низкая отвечаемость эмбриональных Фб на КС Мф обусловлена высоким уровнем спонтанной пролиферации клеток ФЭЧ-16-2, который в среднем в 2,5 раза превышал уровень пролиферации клеток NAF1.

Анализ влияния растворимых факторов функциональных фенотипов Мф на пролиферативный ответ Фб продемонстрировал, что М-CSF-дифференцированные M1(LPS) отличались от M2 клеток более низким пропролиферативным эффектом (1,34 vs 2,3 соответственно, $p=0,07$). Что касается Мф с M2 фенотипом, то КС M2a(IL-4) и M2c(Dex) не обладали значимыми различиями по степени влияния на пролиферативный ответ Фб.

Продукция TGF- β 1 и ростовых факторов

Благодаря контрактильным свойствам и способности активно продуцировать белки ВКМ МиоФб являются ключевыми клетками, участвующими в процессах репарации и фиброгенеза. TGF- β 1 является основным ростовым фактором, стимулирующим дифференцировку Фб в МиоФб, поэтому по уровню продукции данного фактора можно косвенно судить о способности Мф активировать Фб. Из Рисунка 3.2.2.2 А видно, что М-CSF-дифференцированные Мф, поляризованные в присутствии LPS, характеризовались более низким уровнем продукции TGF- β 1 по сравнению с M2 клетками (2137 пг/мл vs 4680 и 4564 пг/мл соответственно), однако различия на уровне тренда ($p=0,07$) обнаруживались только с M2a(IL-4). В свою очередь, различные функциональные фенотипы M2 Мф (a и c) не различались между собой по продукции данного фактора.

Другим биологическим фактором, принимающим участие в фиброгенезе, является ангиогенин, поскольку он способен индуцировать миграцию и адгезию Фб. Оценка его концентрации в супернатантах Мф показала, что М-CSF-индуцированные M1(LPS) не отличались значимо по уровню продукции ангиогенина от клеток с M2 фенотипом, несмотря на то что в целом его концентрация в супернатантах данного типа Мф было более низкой (324 пг/мл). Среди M2 Мф максимальное содержание данного

фактора было характерно для M2c(Dex) и составляло 599,7 пг/мл, однако не отличалось значимо от M2a(IL-4) (403 пг/мл) (Рисунок 3.2.2.2 Б).

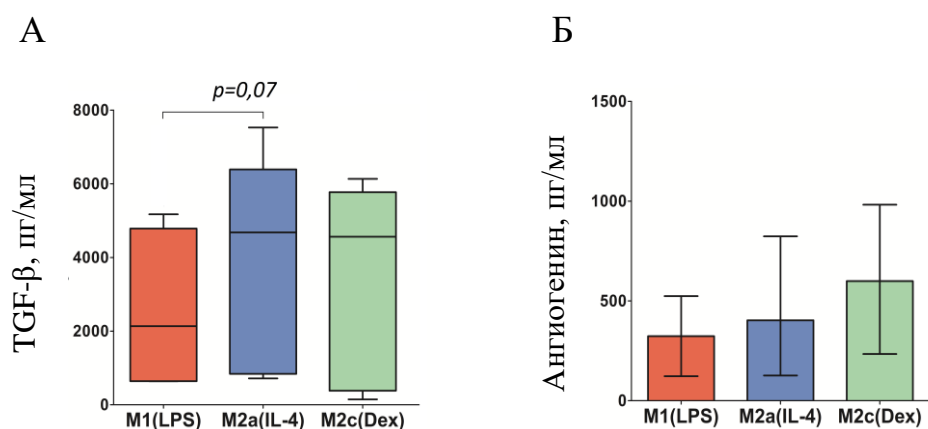


Рисунок 3.2.2.2 – Продукция TGF-β1 (А) и ангиогенина (Б) М-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=4–5.

Таким образом, несмотря на тенденцию к более выраженному стимулирующему влиянию Мф с M2 фенотипом (по сравнению с M1) на пролиферацию Фб и продукцию TGF-β1, мы не выявили значительных различий между эффектами различных функциональных фенотипов Мф на фиброгенез, дифференцированных М-CSF. Учитывая эти данные, а также сопряженность процессов репарации и воспаления, мы предположили, что генерация Мф в условиях, моделирующих *in vitro* воспаление, т.е. в присутствии GM-CSF, позволит выявить различия в регуляции активности фибробластов разными фенотипами Мф.

3.2.3. Прямое влияние GM-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ

Продукция коллагена

GM-CSF-дифференцированные Мф продуцировали коллаген I на хорошо детектируемом уровне, при этом всем функциональным фенотипам, за исключением M2c(Dex), в целом был присущ значимо более высокий уровень продукции коллагена I типа сравнению с клетками,

индуцированными М-CSF (Рисунок 3.2.3.1). Среди GM-CSF-дифференцированных Мф, M1(LPS) характеризовались высоким уровнем продукции коллагена, концентрация которого более чем в 2,5 раза превышала таковую в культурах М-CSF-стимулированных M1(LPS) (8127 пг/мл vs 3346 пг/мл, соответственно; $p=0,05$). Тем не менее, значимых различий с M2a(IL-4) и M2c(Dex) обнаружено не было. Среди M2 Мф наиболее выраженной коллаген-продуцирующей активностью характеризовались M2(LS) (12920 пг/мл), в культурах которых концентрация коллагена I значимо превышала таковую в супернатантах M2a(IL-4) и M2c(Dex) клеток ($p=0,02$ и $p=0,03$ соответственно), а также M1(LPS) на уровне тренда ($p=0,07$).

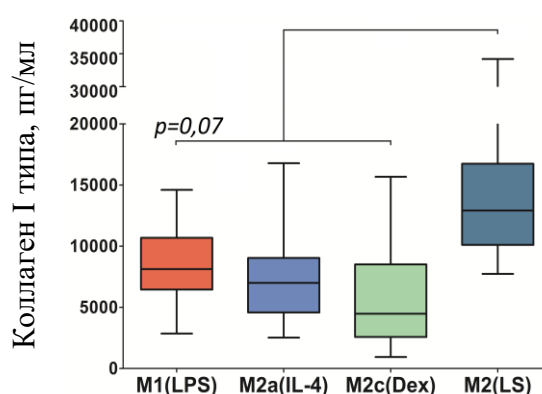


Рисунок 3.2.3.1 – Продукция коллагена I типа GM-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, $n=6-13$, критерий значимости $p<0,05$.

Продукция MMP и TIMP

По сравнению с М-CSF-дифференцированными аналогами, уровень MMP-9 в культурах GM-CSF-дифференцированных Мф был практически в 2 раза ниже (Рисунок 3.2.3.2 А). При этом M1(LPS) характеризовались более низкой, по сравнению с клетками M2 фенотипа, MMP-продуцирующей активностью (4293 пг/мл). Среди M2 Мф наибольшая концентрация MMP-9 выявлялась в культурах M2(LS) (6419 пг/мл), в то время как M2a(IL-4) и M2c(Dex) характеризовались промежуточными уровнями MMP-9 в

супернатантах (5529 и 5194 пг/мл, соответственно). Тем не менее значимых различий среди исследуемых фенотипов обнаружено не было.

Что касается TIMP-1, то GM-CSF-дифференцированные Мф, в отличие от клеток, индуцированных М-CSF, активно продуцировали данный ингибитор (Рисунок 3.2.3.2. Б). «Оппозитные» фенотипы M1(LPS) и M2a(IL-4) продуцировали TIMP-1 на одинаковом уровне (620 пг/мл и 670 пг/мл). Среди M2 культур M2(LS) характеризовались максимальным уровнем продукции TIMP-1 (1709 пг/мл), который значимо превышал таковой для M1 и других M2 подтипов. M2c(Dex), напротив, демонстрировали минимальные значения TIMP-1, которые, однако, не отличались от M1(LPS) и M2a(IL-4) клеток.

Далее была проведена оценка «антифиброгенного» индекса MMP-9/TIMP-1 (Рисунок 3.2.3.2 В). Прежде всего следует отметить, что для GM-CSF-дифференцированных Мф индексы соотношения значительно варьировали от донора к донору, составляя 2,95-23,5 в случае M1(LPS), 3,07-66,8 – M2a(IL-4) и 4,2-94,3 – M2c(Dex). Исключение составляли M2(LS) клетки, для культур которых показатели MMP-9/TIMP-1 среди всех доноров оставались одинаково низкими, варьируя от 2,2 до 8,8. M2c(Dex) отличались максимальным значением индекса MMP-9/TIMP-1, которое составляло 9,66, что значимо превышало показатели M1(LPS), M2a(IL-4) (5,61 и 9,0 соответственно, $p=0,05$) и M2(LS) (3,28; $p=0,018$). Напротив, в условиях дефицита ростовых факторов M2(LS) характеризовались значимо более низкими значениями MMP-9/TIMP-1 по сравнению с M2a(IL-4) и M2c(Dex) ($p=0,018$).

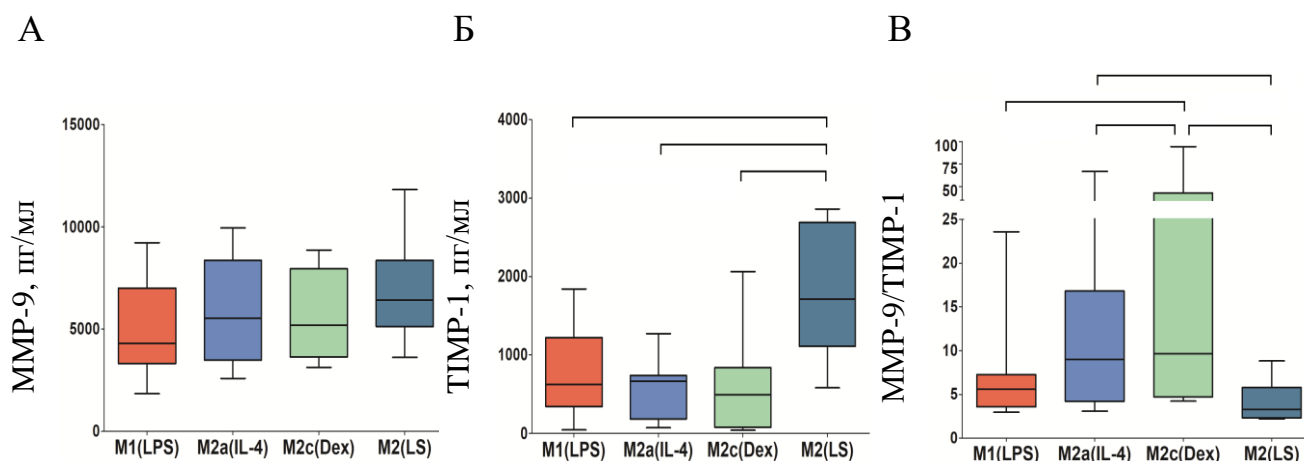


Рисунок 3.2.3.2 – Продукция MMP-9 (А) и TIMP-1 (Б) и индексы соотношения MMP-9/TIMP-1 (В) для GM-CSF-дифференцированных Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, $n=7-9$, критерий значимости $p<0,05$.

Продукция катепсина

Далее исследовали продукцию катепсина L GM-CSF-дифференцированными Мф. Оказалось, что все функциональные фенотипы не имели значимых различий с M-CSF-дифференцированными аналогами, несмотря на то что M2c(Dex), напротив, демонстрировали минимальный уровень продукции катепсина L (Рисунок 3.2.3.3). M1(LPS) практически не отличались по уровню продукции от M2 Мф, и, особенно, M2a(IL-4) и M2c(Dex) (1597,5 пг/мл, 1477,6 пг/мл и 1331,9 пг/мл, соответственно). Среди культур с M2 фенотипом M2(LS) характеризовались более высокой концентрацией катепсина L (2133 пг/мл), которая, однако, отличалась лишь от таковой M2c(Dex) клеток на уровне тренда ($p=0,08$).

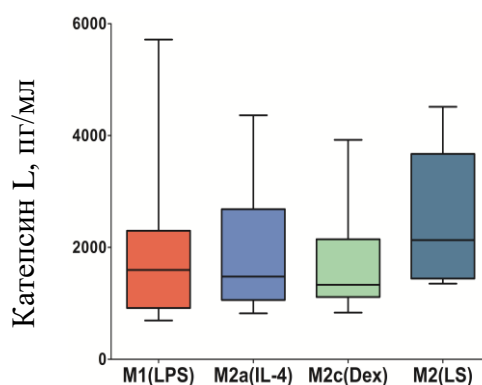


Рисунок 3.2.3.3 – Продукция катепсина L GM-CSF-дифференцированными Мφ, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=5–10.

3.2.4. Опосредованное влияние GM-CSF-дифференцированных Мφ на ВКМ

Влияние на пролиферативный ответ фибробластов

Далее нами было проанализировано влияние КС различных фенотипов Мφ на функциональную активность Фб, включая пролиферативную активность Фб, способность дифференцироваться в МиоФб и продукцию коллагена I типа.

Обработка клеток эмбриональных Фб ФЭЧ-16-2 кондиционными средами GM-CSF-дифференцированными Мφ, в отличие от M-CSF-дифференцированных Мφ, сопровождалась незначительным, но статистически значимым, повышением пролиферативного ответа Фб (в среднем в 1,5 раза; $p < 0,05$ по сравнению с контролем), как показано на Рисунке 3.2.4.1 А. При этом стимулирующий эффект КС M1(LPS) был наименее выраженным (ИС 1,32 расч. ед.), в то время как КС M2 стимулировали пролиферацию Фб в большей степени. Среди Мφ M2 фенотипа M2(LS) характеризовались наиболее активной стимуляцией пролиферации ФЭЧ-16-2 по сравнению с остальными подтипами (Ме 1,69 расч. ед.), а КС M2a(IL-4) и M2c(Dex) усиливали пролиферативный ответ Фб в 1,5 раза. Тем не менее, значимых различий между стимулирующим влиянием КС исследуемых фенотипов Мφ выявлено не было.

Исследование влияния КС GM-CSF-дифференцированных Мф на дермальные Фб взрослого (NAF-1) продемонстрировало, что все подтипы Мф более активно стимулировали пролиферацию дермальных Фб взрослого, NAF1, по сравнению с ФЭЧ-16-2, подобно тому, как это было показано для М-CSF-дифференцированных клеток. КС M1(LPS) характеризовались в целом менее выраженным пропролиферативным эффектом на NAF-1 по сравнению с Мф с M2 фенотипом, однако значимые различия обнаруживались только с M2c(Dex). Среди M2 Мф наиболее выраженный стимулирующий эффект оказывали КС M2c(Dex), которые увеличивали пролиферативную активность фибробластов в 9,2 раза, что превышало ИС M2a(IL-4) и M2(LS) (3,6 и 3,55 расч. ед. соответственно). (Рисунок 3.2.4.1 Б). Таким образом, КС M2c(Dex) обладали способностью значительно стимулировать пролиферацию дермальных Фб *in vitro* по сравнению с другими функциональными фенотипами.

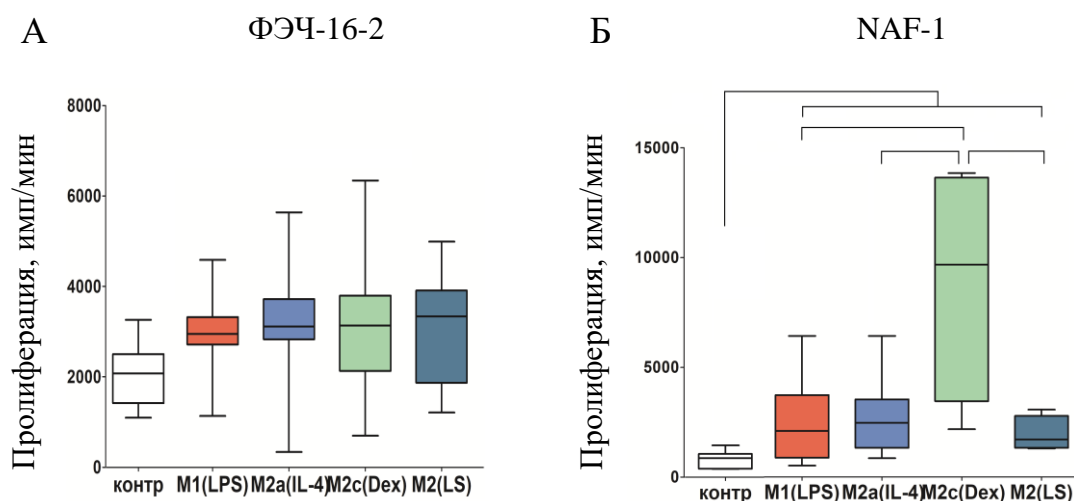


Рисунок 3.2.4.1 – Пролиферативный ответ эмбриональных (А) и дермальных (Б) Фб в присутствии КС GM-CSF-дифференцированных Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=5–12, критерий значимости $p < 0,05$.

Продукция TGF- β 1 и ростовых факторов

Далее нами было проанализировано содержание TGF- β 1 в супернатантах GM-CSF-дифференцированных Мф (Рисунок 3.2.4.2 А). M1(LPS) характеризовались в целом более низким уровнем TGF- β 1 по сравнению с M2 клетками, за исключением M2c(Dex). Среди клеток с M2 фенотипом наблюдалась значительная гетерогенность по продукции данного ростового фактора. Так, отличительной особенностью Мф, генерируемых при поглощении апоптотических клеток, оказался высокий уровень продукции TGF- β 1 (9221,5 пг/мл), который значимо отличался от M2a(IL-4) и M2c(Dex) (4871,9 и 4123,8 пг/мл, соответственно, $p < 0,05$) и от M1(LPS) на уровне тренда (4708,8 пг/мл, $p = 0,07$). M2a(IL-4) демонстрировали промежуточное значение, характеризуясь более высоким содержанием TGF- β 1 по сравнению M2c(Dex) ($p = 0,017$). M2c(Dex), напротив, характеризовались минимальной TGF- β 1-продуцирующей активностью.

Помимо TGF- β 1, также были проанализированы другие факторы, обладающие модулирующим влиянием на функциональную активность Фб, включая VEGF, IGF-1 и ангиогенин (Рисунок 3.2.4.2 Б, В, Г). M1(LPS) демонстрировали минимальные значения VEGF (813 пг/мл), которые при этом значимо отличались от таковых для M2a(IL-4) клеток (2872 пг/мл, $p = 0,04$). Напротив, M2a(IL-4) и M2(LS) активно продуцировали VEGF (1602 пг/мл и 2643 пг/мл соответственно), отличаясь более высоким значением по сравнению с M2c(Dex) (1602 пг/мл, $p = 0,08$).

Исследуемые функциональные фенотипы Мф секретируют IGF-1 на одинаковом низком уровне и не различались между собой (Рисунок 3.2.4.2 Г).

По продукции ангиогенина GM-CSF-дифференцированные культуры отличались более выраженной (в 2 и более раз) продукцией по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами (Рисунок 3.2.4.2 Б). При этом M1(LPS) отличались более высоким уровнем ангиогенина по сравнению с M2a(IL-4) и M2c(Dex) (1732 пг/мл, 1221 пг/мл и 1159 пг/мл соответственно),

однако различия не были статистически значимы. Что касается M2 культур, то наибольший интерес представляли M2(LS), содержание ангиогенина в супернатантах которых было выше более чем в 2,7 раза по сравнению с другими функциональными фенотипами (как M1, так и M2) и достигало 4730 пг/мл.

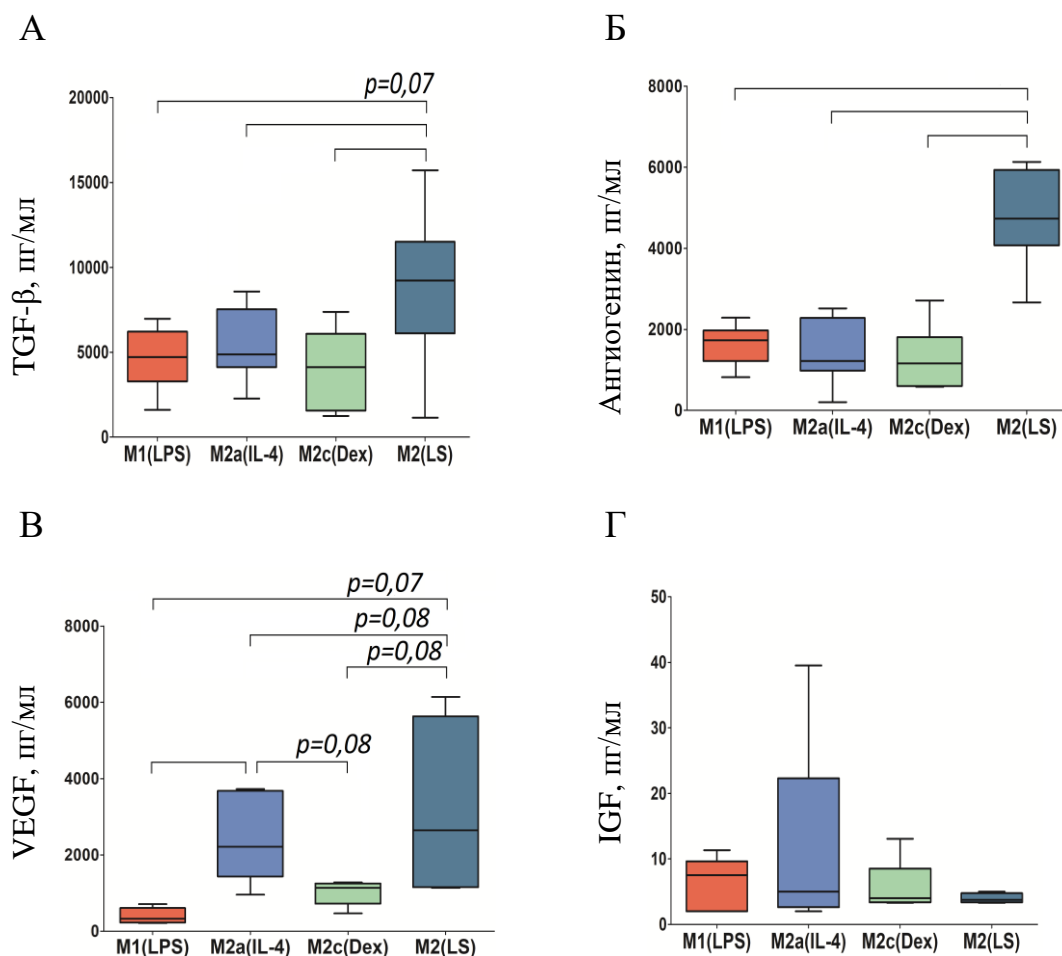


Рисунок 3.2.4.2 – Продукция TGF-β1 (n=6–8), ангиогенина (n=7), VEGF (n=5), IGF-1 (n=5) GM-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, критерий значимости $p<0,05$.

Влияние на экспрессию α-SMA фибробластами

Поскольку нами были обнаружены яркие различия в продукции GM-CSF-дифференцированными Мф TGF-β1, на завершающем этапе было проведено исследование влияния растворимых факторов Мф на экспрессию

фибробластами α -SMA, как наиболее общепринятого маркера для идентификации МиоФб, и коллаген-продуцирующую активность Фб.

Важно отметить, что в культуре клеток NAF1 выявлялось высокое содержание клеток, спонтанно экспрессирующих α -SMA (Me=59%, IQR 50-83%). Поскольку столь значительный уровень α -SMA-позитивных клеток может индуцироваться ростовыми факторами сыворотки (например, TGF- β), что было показано в исследовании U. Varany и соавт. [201], в дальнейших экспериментах была использована бессывороточная среда DMEM/F12.

Анализ влияния КС Мф, индуцированных GM-CSF, на экспрессию α -SMA показал, что в культурах NAF1, обработанных КС Мф, наблюдается возрастание относительного количества α -SMA-позитивных Фб по сравнению с Фб, культивируемыми в бессывороточной среде (Рисунок 3.2.4.3). По сравнению с M2 клетками, M1(LPS) Мф характеризовались меньшей степенью влияния на дифференцировку NAF1 (48% α -SMA-позитивных клеток в культуре) и демонстрировали значимые различия с TGF- β 1-индуцированным (позитивным) контролем (72,5%), а также с КС M2a(IL-4) (67%). Обработка Фб кондиционными средами Мф с M2 фенотипом характеризовалась более выраженным стимулирующим влиянием на экспрессию α -SMA, однако между M2a(IL-4), M2c(Dex) и M2(LS) значимых различий обнаружено не было. Тем не менее, минимальный эффект среди M2 Мф был характерен для M2c(Dex) (57,5%). Примечательно, что культивирование фибробластов в присутствии КС M2(LS) приводило к дифференцировке клеток на уровне TGF- β 1-индуцированного (позитивного) контроля (69,5% и 72,5%, соответственно).

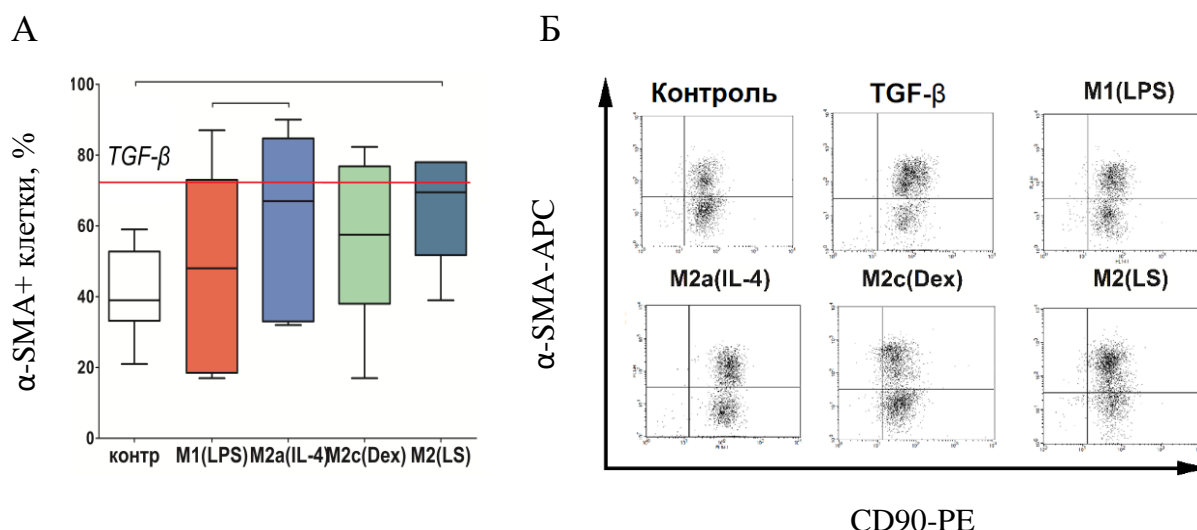


Рисунок 3.2.4.3 – Относительное содержание α-SMA+ клеток в культурах Фб, обработанных КС GM-CSF-дифференцированными Мф (А, n=6–10) и цитометрические данные репрезентативного эксперимента (Б). Красной линией обозначен уровень TGF-β1-индуцированного (позитивного) контроля, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, критерий значимости $p < 0,05$.

Влияние на коллаген-продуцирующую активность фибробластов

Способность активно продуцировать коллаген является важной особенностью МиоФб, отражающей их ключевую роль в стадии накопления ВКМ при фибротическом процессе, поэтому заключительный этап оценки влияния Мф на функциональную активность Фб включал в себя исследование коллаген-продуцирующей активности клеток NAF1. Поскольку сами Мф способны продуцировать коллаген, как было показано в пункте 3.2.3. «Продукция коллагена», в экспериментах Фб подвергали предобработке КС Мф, затем клетки отмывали и культивировали в DMEM/F-12, откуда потом собирали супернатанты. Таким образом, в супернатантах Фб не содержалось примеси коллагена, продуцируемого Мф.

Результаты исследования показали, что растворимые факторы Мф способствовали более интенсивной продукции ВКМ по сравнению с контролем, за исключением M2c(Dex) (Рисунок 3.2.4.4). M1(LPS) менее активно стимулировали продукцию коллагена по сравнению с M2(LS) ($p=0,067$), но не отличались от M2a(IL-4) и M2c(Dex). Среди M2 Мф

наиболее выраженным стимулирующим эффектом отличались КС M2(LS), которые стимулировали продукцию коллагена на уровне TGF- β 1-индуцированного контроля (107,3 нг/мл и 101,3 нг/мл соответственно), что значимо превышало M2a(IL-4) ($p=0,04$) и M2c(Dex) на уровне тренда ($p=0,067$). Напротив, поляризация дексаметазоном приводила к формированию фенотипа Мф, КС которых оказывали минимальное стимулирующее влияние на коллаген-продуцирующую активность Фб (концентрация коллагена 50 нг/мл), который значимо отличался от M2a(IL-4) ($p=0,03$) и M2(LS) клеток на уровне тренда ($p=0,067$).

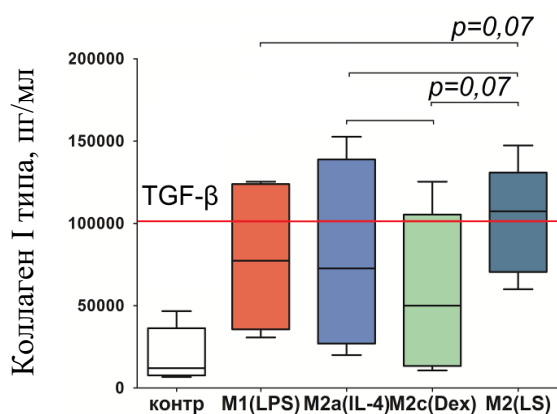


Рисунок 3.2.4.4 – Продукция коллагена I типа дермальными Фб, обработанными КС GM-CSF-дифференцированных Мф. Красной линией обозначен уровень TGF- β 1-индуцированного (позитивного) контроля, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, $n=5-8$, критерий значимости $p < 0,05$.

Таким образом, стимуляторный эффект, который оказывают на дифференцировку клеток NAF1 КС M2(LS), сопряжен с усилением коллаген-продуцирующей активности Фб, в то время как стимуляция пролиферативного ответа Фб, присущая M2c(Dex) клеткам, не сопровождается значительным увеличением секреции коллагена I типа.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гетерогенность и пластичность Мф является одним из важнейших свойств этих клеток, которое позволяет им осуществлять регуляцию гомеостаза ткани. Исследования *in vivo* на экспериментальных животных подтвердили ключевую роль Мф в регуляции фибротических процессов [108–112]. В данной работе были охарактеризованы М1, М2а, М2с и М2(LS) Мф человека, генерируемые из моноцитов периферической крови в присутствии соответствующих поляризующих стимулов, и было описано их влияние на функциональную активность Фб, а также проанализированы факторы, оказывающие прямое влияние на отложение ВКМ.

Прежде всего, следует отметить, что ранее в нескольких работах было продемонстрировано, что *in vitro* Мф с М1 и М2 фенотипом могут быть получены как в условиях дифференцировки М-CSF, так и GM-CSF, поскольку функциональный фенотип Мф определяется также поляризующим стимулом [2, 3, 202]. Тем не менее, существуют некоторые различия в типах Мф, дифференцированных тем или иным образом. Так, согласно нашим данным, морфология Мф, генерируемых из моноцитов, прежде всего определялась дифференцировочным фактором (М-CSF vs GM-CSF) и не зависела существенно от поляризующих стимулов, что свидетельствует о вовлеченности дифференцировочных сигналов в формирование цитоскелета Мф. Аналогичные данные были получены в работе F. Rei-Giraud и соавт., в которой добавление GM-CSF в среду RPMI, дополненную 10% сыворотки, приводило к появлению клеток с округлой морфологией, а М-CSF – фибробластоподобной [203], и исследовании D. Vogel и соавт. [204].

М-CSF- и GM-CSF-дифференцированные Мф отличались также по экспрессии поверхностных CD маркеров. Так, в присутствии GM-CSF Мф активнее экспрессируют CD206 и HLA-DR по сравнению с М-CSF-дифференцированными аналогами, а культуры М1(LPS) характеризуются

также и более высоким содержанием CD86-позитивных клеток в условиях дифференцировки GM-CSF. При этом культуры M1 клеток характеризовались значимо большим уровнем CD86-позитивных клеток по сравнению с M2, в то время как клетки с M2 фенотипом и особенно M2c(Dex) отличались высоким содержанием CD163 и MerTK, что в целом согласуется с данными литературы [23, 34, 46]. Не противоречат литературным данным и сравнительно высокое содержание CD206-позитивных клеток в культурах M1(LPS) GM-CSF-дифференцированных Мф, поскольку известно, что GM-CSF стимулирует экспрессию маннозного рецептора на Мф [2, 41, 42].

Цитокиновый профиль M- и GM-CSF-дифференцированных культур также различался. Так, добавление GM-CSF приводило к формированию клеток, характеризующихся большим уровнем провоспалительных цитокинов (IL-1 β , MIP-1 β и TNF- α) по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами. При этом после стимуляции клеток LPS дополнительно появлялись различия между культурами Мф по содержанию таких цитокинов, как IL-2, -4, -5, -6, -17 и G-CSF. Эти данные согласуются с исследованием D. Vogel и соавт., в котором GM-CSF-дифференцированные Мф характеризовались более выраженным уровнем TNF- α и IL-6 по сравнению с Мф, индуцированными M-CSF [204], а также M. Jaguin и соавт., в котором M1 Мф, дифференцированные в присутствии GM-CSF, характеризовались значимо большим уровнем TNF- α и IL-1 β [2]. Однако в отличие от M. Jaguin и соавт. мы не обнаружили различий в содержании IL-10 между M- и GM-CSF-дифференцированными Мф.

Что касается Мф с M1 и M2 фенотипом, то M1 клетки отличались более высокой концентрацией провоспалительных цитокинов, уровень которых в большинстве случаев увеличивался при стимуляции LPS, а M2a(IL-4) и M2c(Dex) в целом характеризовались схожим цитокиновым профилем с низким содержанием провоспалительных цитокинов и

относительно высоким противовоспалительных по сравнению с M1 клетками и не различались существенно между собой.

Еще одним показателем, который был использован нами для характеристики Mф, являлась аллостимуляторная активность. Так как данный параметр является интегральным и детерминируется экспрессией MHC, костимуляторных и коингибиторных молекул, продукцией цитокинов и ферментов, то он мог являться универсальным показателем для идентификации Mф с M1 и M2 фенотипом. ROC-анализ продемонстрировал высокую специфичность и чувствительность данного метода. При этом интересно, что M1 Mф, дифференцированные различными стимулами, значимо отличались между собой по уровню аллостимуляторной активности, тогда как M2 Mф не имели таких различий. Это может быть связано с тем, что при стимуляции LPS M- и GM-CSF-дифференцированные M1 Mф отличались большими различиями по профилю секретируемых цитокинов по сравнению с нестимулированными M2a(IL-4) и M2c(Dex). С другой стороны, M2(LS) отличались и от M1, и от других M2 фенотипов фенотипически и по цитокиновому профилю, но тем не менее также, как и другие M2 Mф, характеризовались низким стимулирующим эффектом на пролиферативный ответ аллогенных Т-клеток в СКЛ, что свидетельствует о том, что аллостимуляторная активность, по-видимому, определяется многими параметрами и ее показатель (высокая/низкая) является универсальной характеристикой M1 или M2 Mф.

Учитывая вышеизложенные данные, можно также заключить, что функциональный фенотип Mф определяется как условиями дифференцировки, так и поляризующим стимулом.

Механизмы регуляторного влияния Mф на фиброгенез, по-видимому, многочисленны. В целом можно определить прямое влияние на ВКМ и регулирующее воздействие на функциональную активность клеток-продуцентов ВКМ.

Продукция протеаз, способствующих деградации коллагена, является одним из важнейших механизмов прямого антифиброгенного влияния на ВКМ, откладывающийся при развитии фибротического процесса. Активность данных протеаз преимущественно регулируется специфическими (TIMP) и неспецифическими (α 2-макроглобулин) ингибиторами [124]. Баланс данных факторов в организме свидетельствует о преобладании одного из процессов (синтеза или деградации ВКМ) над другим и может косвенно отражать стадию фибротического процесса. Полагают, что M1 Мф характеризуются более выраженной продукцией MMP, по сравнению с Мф с M2 фенотипом. Тем не менее, в отношении MMP-9 имеются некоторые неопределенности. Так, в работе N.A. Jager и соавт. M2a(IL-4) и M2c(IL-10), дифференцированные M-CSF, характеризовались значимо более высоким уровнем экспрессии мРНК MMP-9 по сравнению с M1(IFN γ +LPS) [132]. Тем не менее, в других исследованиях [131, 134] было показано, что экспрессия мРНК M-CSF-дифференцированных M1(IFN γ +LPS) Мф не отличалась от таковой для M2a(IL-4) Мф, как и в нашем исследовании.

Помимо MMPs, другой протеазой, субстратом для которой является ВКМ и которая активно продуцируется Мф, является катепсин L [205, 206], однако ранее уровень продукции катепсина L различными функциональными фенотипами Мф не оценивался. Согласно полученным нами данным, значимых различий в продукции катепсина всеми исследуемыми типами Мф обнаружено не было, что свидетельствует о том, что условия генерации Мф оказывают незначительное влияние на катепсин-продуцирующую активность этих клеток.

Представляет собой интерес также тот факт, что в культурах M-CSF-дифференцированных Мф, в отличие от клеток, индуцированных GM-CSF, обнаруживался недетектируемый уровень TIMP-1. Поскольку известно, что TIMP-1 у человека является индуцибельным ингибитором [207], а GM-CSF, наряду с другими факторами, такими как TNF α , LPS, IL-4 и IL-10, стимулирует его продукцию [208–210], можно предположить, что условия

дифференцировки влияют на способность Мф к продукции TIMP-1. Данные результаты также согласуются с работой Е.М. Hayes и соавт., в которой было продемонстрировано, что М-CSF-дифференцированные Мф, вне зависимости от поляризующего фактора (LPS+IFN γ , TNF α или IL-4), не экспрессировали мРНК TIMP-1 [134].

Недавние исследования продемонстрировали, что Мф способны напрямую оказывать репаративное воздействие, продуцируя коллаген [181]. Также ранее было показано, что Мф человека способны секретировать фибронектин, коллаген VI и VIII типа [180, 182–184]. В нашей работе мы демонстрируем, что все исследуемые подтипы Мф человека способны продуцировать коллаген I типа, который является превалирующим компонентом ВКМ при ранозаживлении во взрослом организме. Интересно, что концентрация коллагена, определяемая в супернатантах Мф, различалась приблизительно в 10 раз по сравнению с продукцией коллагена нестимулированными Фб и в 100 раз – по сравнению с Фб, дифференцированными TGF- β 1. Результаты нашего исследования также демонстрируют различия в продукции коллагена I типа между различными функциональными фенотипами Мф. В целом, в присутствии GM-CSF, Мф дифференцируются в клетки с более выраженной коллаген-продуцирующей активностью. При этом наибольший уровень продукции коллагена был характерен для Мф, поляризуемых после взаимодействия с апоптотическими клетками, что может отражать один из путей реализации их репаративного потенциала.

В целом, обобщая полученные данные по продукции факторов, оказывающих прямое влияние на ВКМ, можно заключить, что М-CSF-дифференцированные Мф, характеризующиеся более низкой продукцией коллагена I, а также крайне низким уровнем TIMP-1, обладают более выраженной антифиброгенной активностью по сравнению с GM-CSF-дифференцированными аналогами. Среди GM-CSF-индуцированных Мф M2c(Dex) имели наиболее высокое значение индекса MMP-9/TIMP-1, а также

характеризовались минимальным уровнем продукции коллагена I. Поскольку считается, что клетки с M2c фенотипом принимают активное участие в разрешении фиброза, когда деградация ВКМ преобладает над его синтезом [13], данная особенность GM-CSF-дифференцированных M2c(Dex) может отражать один из вероятных механизмов антифиброгенной активности этих клеток. Напротив, M2(LS) клетки демонстрировали высокий уровень продукции TIMP-1 и коллагена I, а также и низкий индекс MMP-9/TIMP-1, что может свидетельствовать о профиброгенном потенциале этих клеток. Тем не менее, поскольку данная работа была ограничена только одним видом MMP и TIMP, для получения однозначных выводов необходимо проанализировать продукцию остальных типов протеаз и ингибиторов.

Продуцируя факторы роста и цитокины, Mφ способны оказывать регуляторное влияние на фиброгенез посредством стимуляции/ингибирования функциональной активности Фб. Предполагается, что M2 Mφ человека обладают стимулирующим действием на пролиферативную активность Фб, их дифференцировку в МиоФб и, соответственно, коллаген-продуцирующую активность [192, 193] *in vitro*. С другой стороны, в исследовании Ploeger и соавт. продемонстрировали, что KC M2 Mφ, несмотря на выраженный пропролиферативный эффект, не оказывали значимого влияния на уровень экспрессии мРНК α -SMA и $\alpha 1$ цепи коллагена I типа в Фб [194].

В то же время в отношении M1 Mφ существует еще большая неоднозначность – в некоторых исследованиях они ингибировали пролиферацию Фб [192, 193], экспрессию ими α -SMA [193] и $\alpha 1$ цепи коллагена I типа [193, 194], тогда как в других либо не оказывали никакого влияния на пролиферативный ответ Фб и их дифференцировку [104, 194], либо стимулировали пролиферацию Фб, хотя и в меньшей степени, чем M2 Mφ [193]. Важно отметить, что во всех вышеперечисленных исследованиях в качестве источника Mφ с M2 фенотипом использовались Mφ, поляризованные IL-4 отдельно или в комбинации с IL-13, т.е. «M2a» Mφ,

тогда как другие подтипы M2 Мф не изучались. Согласно полученным в настоящей работе данным, растворимые факторы как M1, так и M2 Мф, дифференцированных GM-CSF, стимулировали пролиферативную, дифференцировочную и коллаген-продуцирующую активность дермальных Фб, однако степень их влияния различалась. Так, наибольший пролиферативный эффект оказывали M2c(Dex), в то время как M2a(IL-4) и, особенно, M2(LS) стимулировали экспрессию α -SMA фибробластами и продукцию ими коллагена I типа. В свою очередь, M1(LPS) в меньшей степени, чем M2a(IL-4) и M2(LS) клетки, стимулировали дифференцировку Фб и продукцию ими коллагена. Поскольку было показано, что уровень продукции IL-10 макрофагами человека обратно коррелирует с экспрессией α -SMA и Col 1a1 в Фб [169], можно предположить, что высокое содержание этого цитокина в супернатантах M1(LPS) способствовало менее выраженному стимулирующему влиянию этих клеток на функциональную активность Фб. С другой стороны, M1(LPS) клетки отличались также высоким уровнем IL-1 β , TNF α и IFN γ , которые, как известно, способны усиливать продукцию ВКМ через активацию рецептора TGF- β типа I [155].

В нашей работе было показано, что M2 Мф, фенотип которых индуцируется поглощением апоптотических клеток, оказывают значительное влияние на коллаген-продуцирующую активность и дифференцировку Фб, но умеренно стимулируют пролиферативный ответ Фб по сравнению с M2c(Dex). Полученные результаты в целом согласуются с работой N. Nacu и соавт., в которой было продемонстрировано, что после поглощения апоптотических клеток Мф активно стимулировали продукцию коллагена Фб, однако не влияли значимо на пролиферативный уровень данных клеток [195]. С другой стороны, это противоречит работе Kim Y.B., в которой был показан обратный эффект: фагоцитоз апоптотических клеток макрофагами приводил к формированию клеток, растворимые факторы которых подавляли экспрессию мРНК Col1 и фибронектина, а также способствовали снижению экспрессии миофибробластных маркеров (α -SMA) в легочных фибробластах,

активированных TGF- β 1 [196]. Вероятно, это связано с тем, что исследование Kim и соавт. было выполнено с использованием Мф мыши, которые, как известно, имеют отличия от Мф человека.

Известно, что TGF- β 1 является важным фактором дифференцировки Фб, поэтому его высокий уровень продукции, обнаруживаемый в супернатантах M2(LS), может объяснять стимулирующее влияние на дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность NAF1. Тем не менее, по-видимому, TGF- β 1 является не единственным фактором, опосредующим влияние Мф на экспрессию α -SMA, поскольку M1(LPS) клетки, несмотря на одинаковый уровень продукции TGF- β 1 с M2a(IL-4), характеризовались значимо меньшим стимулирующим влиянием на дифференцировку Фб. Это может быть связано с более низким содержанием VEGF в супернатантах M1(LPS), который, как считается, также оказывает стимулирующее влияние на дифференцировку и пролиферацию Фб, или более высоким уровнем IL-10 и IFN γ , которые по данным некоторых исследований [135, 166–168] обладают антифиброгенной активностью. Кроме того, это может быть обусловлено разницей в продукции PDGF, который не исследовался в данной работе, но, как было показано, является одним из путей влияния Мф на дифференцировку Фб [104].

Интересно также что, несмотря на обнаруженный нами выраженный пропролиферативный потенциал КС M2c(Dex), содержание цитокинов и ростовых факторов в их КС было либо схожим с другими функциональными фенотипами, либо более низким. Таким образом, вероятно, пролиферация Фб детерминируется какими-то другими факторами, не исследованными нами. Механизм данного явления требует дальнейшего изучения.

В целом, учитывая вышеизложенные факты, можно отметить, что все исследуемые функциональные фенотипы GM-CSF-дифференцированных Мф обладают профиброгенным потенциалом. При этом M2(LS) оказывают наиболее выраженный стимулирующий эффект на Фб, усиливая дифференцировку и секрецию коллагена, а также обладая способностью

активно продуцировать коллаген I типа и ингибиторы металлопротеиназ, а M2c(Dex), напротив, оказывают незначительное стимулирующее влияние на продукцию коллагена и наименее выраженное, по сравнению с другими M2 фенотипами, стимулирующее влияние на дифференцировку Фб, а также характеризуются минимальным уровнем продукции TGF- β 1 и коллагена I типа и максимальным «антифиброгенным» индексом соотношения MMP-9/TIMP-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные в данной работе исследования позволяют заключить, что Мф, являются крайне гетерогенной популяцией клеток, чьи функции в значительной мере определяются условиями дифференцировки и поляризации. Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки с М1 и М2 фенотипом могут быть получены как в условиях дифференцировки М-, так и GM-CSF, однако при этом клетки имеют некоторые фенотипические и функциональные различия.

Мф, поляризованные LPS, характеризуются активной продукцией про- и противовоспалительных факторов, относительно низким уровнем VEGF и TGF- β 1, способностью к продукции коллагена I типа и катепсина L, а также обладают выраженной аллостимуляторной активностью, уровень которой, как и уровень продукции коллагена, детерминируется дифференцировочными факторами (генерируемые в присутствии GM-CSF М1 клетки обладают большей аллостимуляторной активностью, чем дифференцированные М-CSF).

Поляризация Мф в М2а интерлейкином-4 сопровождается приобретением фенотипа с низкой аллостимуляторной активностью, независимо от типа дифференцировочного фактора. При этом и GM- и М-CSF-дифференцированные М2а(IL-4) клетки в равной степени характеризуются выраженной продукцией IL-8, MCP-1, VEGF, MMP-9, а также продукцией коллагена I типа и катепсина L.

В свою очередь, обработка Мф дексаметазоном (индукция М2с фенотипа), приводит к образованию Мф с низкой аллостимуляторной активностью как в случае М-, так и GM-CSF-индуцированных клеток. При этом, несмотря на схожий с М2а(IL-4) в целом профиль секреции цитокинов, хемокинов и иных биологических агентов, таких как коллаген I типа, катепсин L, MMP и TIMP, данные клетки отличаются по способности

оказывать влияние на пролиферативный ответ Фб и продукцию ими коллагена. Так, GM-CSF-дифференцированные M2c(Dex) обладают выраженной стимулирующей активностью в отношении пролиферации дермальных Фб, однако незначительно стимулируют секрецию ими коллагена.

M2 Мф, генерируемые в условиях дефицита ростовых факторов (M2(LS)), оказались уникальной популяцией Мф, отличной от иных M2 фенотипов. Так, они характеризовались низкой аллостимуляторной активностью, характерной для всех Мф с M2 фенотипом, однако активно секретировали некоторые провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , IL-5, IL-6 и IL-17, а также характеризовались высоким уровнем продукции TGF- β 1, TIMP-1, коллагена I типа и катепсина L. Кроме того, M2(LS) отличались от других фенотипов более выраженным стимулирующим влиянием на продукцию фибробластами коллагена.

В нашем исследовании было показано, что Мф способны оказывать влияние на активность Фб, стимулируя их пролиферацию и дифференцировку в МиоФб, а также продукцию ими коллагена I типа. Важно, что этот эффект во многом определялся функциональным фенотипом Мф. Так, растворимые факторы M2c(Dex), дифференцированных GM-CSF, оказывали максимальный стимулирующий эффект на пролиферацию Фб по сравнению с остальными типами клеток, в то время как M2(LS) прежде всего индуцировали дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность Фб, а на пролиферацию оказывали умеренное стимулирующее влияние. Наряду с этим, эффекты M1(LPS) на пролиферацию и дифференцировку дермальных Фб, но не на продукцию коллагена, оказались самыми минимальными среди всех исследуемых подтипов Мф.

Поскольку в работе во многом исследовались КС Мф (их секретом и влияние на Фб), то можно заключить, что секреторная активность различных подтипов Мф, определяемая сигналами микроокружения, является важным механизмом в регуляции различных процессов в организме, включая процесс

фиброгенеза.

В целом, полученные данные свидетельствуют о разностороннем влиянии дифференцировочных и поляризующих стимулов на формирование функционального фенотипа Мф человека.

ВЫВОДЫ

1. М-CSF-дифференцированные макрофаги обладают фибробластоподобной морфологией и в ответ на провоспалительные стимулы (LPS/IFN γ) характеризуются низкой экспрессией M1-ассоциированного маркера (CD86) и умеренным уровнем продукции про-/противовоспалительных цитокинов, а в ответ на противовоспалительные сигналы (IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) – высокой экспрессией M2-ассоциированных маркеров (CD163, MerTK) и низкой продукцией про-/противовоспалительных цитокинов, что свидетельствует о низкой способности этих клеток к формированию M1 фенотипа и высокой способности к поляризации в макрофаги с M2 фенотипами.
2. GM-CSF-дифференцированные макрофаги обладают преимущественно округлой морфологией, характеризуются высокой экспрессией CD86 и продукцией провоспалительных цитокинов в ответ на провоспалительные стимулы и высокой экспрессией M2-ассоциированных маркеров, и низким уровнем продукции провоспалительных цитокинов в ответ на противовоспалительные стимулы, что свидетельствует о более высокой пластичности GM-CSF-дифференцированных макрофагов по сравнению с М-CSF дифференцированными макрофагами.
3. Макрофаги M1 фенотипа обладают выраженной аллостимуляторной активностью, уровень которой детерминируется дифференцировочными факторами (GM-CSF>M-CSF), в то время как макрофаги M2 фенотипа характеризуются низкой аллостимуляторной активностью, независимо от типа дифференцировочного и поляризующего сигнала, что позволяет использовать аллостимуляторную активность для идентификации M1 и M2 макрофагов человека.

4. M-CSF-дифференцированные макрофаги вне зависимости от поляризующего стимула характеризуются низким уровнем продукции TIMP-1, высокими значениями MMP-9/TIMP-1 и умеренной продукцией коллагена I, демонстрируя преимущественно антифиброгенные свойства, в то время как GM-CSF-дифференцированные макрофаги проявляют как антифиброгенную (M2c(Dex)), так и профиброгенную (M2(LS)) активность (высокий уровень TIMP-1 и коллагена I, низкие значения MMP-9/TIMP-1), что свидетельствует о вовлечении дифференцировочных и поляризующих сигналов в модуляцию про-/антифиброгенных свойств макрофагов.
5. Растворимые факторы GM-CSF-дифференцированных макрофагов (независимо от функционального фенотипа) стимулируют функциональную активность фибробластов. При этом M2c(Dex) обладают наиболее выраженным эффектом на пролиферацию, тогда как M2(LS), отличающиеся максимальной продукцией TGF- β 1, в большей степени стимулируют дифференцировку фибробластов и продукцию коллагена, что свидетельствует о вариабельности профиброгенных эффектов, опосредованных различными функциональными типами макрофагов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ИС – индекс стимуляции

КС – кондиционная среда

Мф – макрофаг(и)

МиоФб – миофибробласт(ы)

ММР – матричная металлопротеиназа(ы)

МНК – моноклеарные клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКЛ – смешанная культура лейкоцитов

Фб – фибробласт(ы)

ФЭЧ – фибробласты эмбриона человека

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭнМП – эндотелиально-мезенхимальный переход

α -SMA – α -гладкомышечный актин

A2AR – рецептор аденозина 2A

ABCG1 – ATP-binding cassette sub-family G member 1

CCL, CXCL, CX3CL – хемокиновый лиганд

CCR, CXCR – хемокиновый рецептор

CD – кластер дифференцировки

CTGF – фактор роста соединительной ткани

Dex – дексаметазон

EGF – эпидермальный фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HGF – фактор роста гепатоцитов

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IFN – интерферон

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IL – интерлейкин

IRF – регуляторный фактор интерферона

LPS – липополисахарид

LS – low serum, дефицит сывороточных факторов

LXR- α – liver X receptor alpha

MCP - monocyte chemoattractant protein

M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор

MerTK – тирозин-киназа MER

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MIP-1 β – макрофагальный белок воспаления 1 β

NAF – нормальные фибробласты взрослого

PDGF – фактор роста, продуцируемый тромбоцитами

PGE – простагландин E

PPAR- γ – Peroxisome proliferator-activated receptor γ

SOCS – супрессор цитокиновых сигнальных белков

STAT – преобразователь сигнала и активатор транскрипции

TGF- β – трансформирующий фактор роста β

TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ

TNF α – фактор некроза опухоли α

uPARAP – the urokinase receptor associated protein

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huang X. Polarizing Macrophages In Vitro / X. Huang, Y. Li, M. Fu, H.B. Xin // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – № 1784. – P. 119-126
2. Jaguin M. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin / M. Jaguin, N. Houlbert, O. Fardel, V. Lecureur // *Cell. Immunol.* – 2013. – Vol. 281. – № 1. – P. 51-61
3. Waldo S.W. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques / S. W. Waldo, Y. Li, C. Buono, B. Zhao, E. M. Billings, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2008. – Vol. 172. – № 4. – P. 1112-1126
4. Beyer M. High-resolution transcriptome of human macrophages / M. Beyer, M. R. Mallmann, J. Xue, A. Staratschek-Jox, D. Vorholt, et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. - № 9. – P. e45466
5. Wynn T.A. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis / T. A. Wynn, K.M. Vannella // *Immunity.* – 2016. – Vol. 44. – № 3. – P. 450-462
6. Darby I.A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing / I. A. Darby, B. Laverdet, F. Bonté, A. Desmoulière // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* – 2014. – Vol. 6. – № 7. – P. 301-311
7. Hinz B. The myofibroblast: one function, multiple origins / B. Hinz, S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M. L. Bochaton-Piallat // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170. – № 6. – P. 1807-1816
8. Distler J.H.W. Shared and distinct mechanisms of fibrosis / J. H. W Distler, A. H. Györfi, M. Ramanujam, M. L. Whitfield, M. Königshoff, et al. // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2019. – Vol. 15. – № 12. – P. 705-730
9. Parker M.W. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop / M. W. Parker, D. Rossi, M. Peterson, K. Smith, K. Sikström, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124 – № 4. – P. 1622-1635

10. Watson C.J. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype / C. J. Watson, P. Collier, I. Tea, R. Neary, J. A. Watson, et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – Vol. 23. – № 8. – P. 2176-2188
11. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis / T. A. Wynn // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214. – № 2. – P. 199-210
12. Pakshir P. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication / P. Pakshir, B. Hinz // *Matrix Biol.* – 2018. – № 68-69. – P. 81-93
13. Adhyatmika A. The Elusive Antifibrotic Macrophage / A. Adhyatmika, K. S. S. Putri, L. Beljaars, B. N. Melgert // *Front. Med.* – 2015. – Vol. 2. – P. 81
14. Van Linthout S. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells / S. Van Linthout, K. Miteva, C. Tschöpe // *Cardiovasc. Res.* – 2014. – Vol. 102. – № 2. – P. 258-269
15. Wermuth P.J. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases / P. J. Wermuth, S. A. Jimenez // *Clin. Transl. Med.* – 2015. – № 4. – P. 2
16. Sindrilaru A. Disclosure of the Culprits: Macrophages-Versatile Regulators of Wound Healing / A. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek // *Adv. Wound Care (New Rochelle).* – 2013. – Vol. 2. – № 7. – P. 357-368
17. Hesketh M. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing / M. Hesketh, K. B. Sahin, Z. E. West, R. Z. Murray // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – № 7. – P. 1545
18. Герасимова Е.В. Функциональные нарушения макрофагов при ревматоидном артрите и атеросклерозе / Е.В. Герасимова, Т.В Попкова // *Научно-практическая ревматология.* – 2018. – Т. 56. – № 4. – С. 486-493
19. Лохонина А.В. Морфофункциональная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения / А. В. Лохонина, А. В. Ельчанинов, И. В. Арутюнян, А. С. Покусаев, А. В. Макаров и соавт. // *Гены & Клетки.* – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 56-62

20. Iqbal S. Phenotypical and functional characterization of polarized human macrophages: degree of Master of Science: 29.01.2015/ Iqbal Sailma. – Ottawa, Canada, 2015. – 131 p.
21. Hashimoto S. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages / S. Hashimoto, T. Suzuki, H. Y. Dong, N. Yamazaki, K. Matsushima // *Blood*. – 1999. – Vol. 94. – № 3. – P. 837-844
22. Lacey D.C. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models / D. C. Lacey, A. Achuthan, A. J. Fleetwood, H. Dinh, J. Roiniotis, et al. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – № 11. – P. 5752-5765
23. Никонова А.А. Характеристика и роль различных популяций макрофагов в патогенезе острых и хронических заболеваний легких / А. А. Никонова, М. Р. Хаитов, Р. М. Хаитов // *Медицинская иммунология*. – 2017. – Т. 19. – № 6. – С. 657-672
24. Ferreira M.A. Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies / M. A. Ferreira // *Mediators Inflamm.* – 2003. – Vol. 12. – № 5. – P. 259–267.
25. Mantovani A. Chemokines in neoplastic progression / A. Mantovani // *Semin. Cancer Biol.* – 2004. – Vol. 14. - № 3. – P. 147–148.
26. Mosser D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D. M. Mosser, J. P. Edwards // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – № 12. – P. 958-969
27. Murray P. J. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P. J. Murray, J. E. Allen, S. K. Biswas, E. A. Fisher, D. W. Gilroy, et al. // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41. – № 1. – P. 14-20
28. Chistiakov D.A. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2 / D. A. Chistiakov, V. A. Myasoedova, V. V. Revin, A. N. Orekhov, Y. V. Bobryshev // *Immunobiology*. – 2018. – Vol. 223. – № 1. – P. 101-111

29. Tugal D. Transcriptional control of macrophage polarization / D. Tugal, X. Liao, M. K. Jain // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – Vol. 33. – № 6. – P. 1135-1144
30. Wang L.X. M2b macrophage polarization and its roles in diseases / L. X. Wang, S. X. Zhang, H. J. Wu, X. L. Rong, J. Guo // *J. Leukoc. Biol.* – 2019. – Vol. 106. - № 2. – P. 345-358
31. Filardy A.A. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages / A. A. Filardy, D. R. Pires, M. P. Nunes, C. M. Takiya, C. G. Freire-de-Lima, et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185. – № 4. – P. 2044-2050
32. Krzyszczyk P. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes / P. Krzyszczyk, R. Schloss, A. Palmer, F. Berthiaume // *Front. Physiol.* – 2018. – № 9. – P. 419
33. Palma A. Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States / A. Palma, A. S. Jarrah, P. Tieri, G. Cesareni, F. Castiglione // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol. 9. – P.1659
34. Lurier E.B. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing / E. B. Lurier, D. Dalton, W. Dampier, P. Raman, S. Nassiri, et al. // *Immunobiology.* – 2017. – Vol. 222. – № 7. – P. 847-856
35. Craig V.J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis / V.J. Craig, L. Zhang, J.S. Hagood, C.A. Owen // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 53. – № 5. – P. 585–600
36. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms / T. Röszer // *Mediators Inflamm.* – 2015. – № 2015. – P. 816460
37. Lolmede K. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-

- 9-dependent pathways / K. Lolmede, L. Campana, M. Vezzoli, L. Bosurgi, R. Tonlorenzi, et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2009 – Vol. 85. – №5. – P. 779-787
38. Koning N. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation / N. Koning, M. van Eijk, W. Pouwels, M. S. Brouwer, D. Voehringer, et al. // *J. Innate Immun.* – 2010. – Vol. 2. – № 2. – P. 195-200
 39. Relloso M. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents / M. Relloso, A. Puig-Kröger, O. M. Pello, J. L. Rodríguez-Fernández, G. de la Rosa // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – № 6. – P. 2634-2643
 40. Stein M. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation / M. Stein, S. Keshav, N. Harris, S. Gordon // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 176. – № 1. – P. 287-292
 41. Itoh C. GM-CSF differentiation of human monocytes stabilizes macrophage state via oxidative signaling / C. Itoh, C. Gunnarsson, G. Babunovic, A. Nibasumba, N. Akilimali, et al. // *BioRxiv.* – 2020. – P. e318352
 42. Lescoat A. Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement / A. Lescoat, A. Ballerie, Y. Augagneur, C. Morzadec, L. Vernhet, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – № 3. – P. 894
 43. Martinez F. O. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression / F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, A. Mantovani // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – № 10. – P. 7303-7311
 44. Lefèvre L. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum* / L. Lefèvre, G. Lugo-Villarino, E. Meunier, A. Valentin, D. Olanier, et al. // *Immunity.* – 2013. – Vol. 38. – № 5. – P. 1038-1049

45. Sung S.J. Dependence of Glomerulonephritis Induction on Novel Intraglomerular Alternatively Activated Bone Marrow-Derived Macrophages and Mac-1 and PD-L1 in Lupus-Prone NZM2328 Mice / S. J. Sung, Y. Ge, C. Dai, H. Wang, S. M. Fu // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198. – № 7. – P 2589-2601
46. Zizzo G. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction / G. Zizzo, B. A. Hilliard, M. Monestier, P. L. Cohen // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189. – № 7. – P. 3508-3520
47. Ferrante C.J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing / C. J. Ferrante, S. J. Leibovich // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. – 2012. – Vol. 1. – № 1. – P. 10-16
48. Anders H.J. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis / H. J. Anders, M. Ryu // *Kidney Int.* – 2011. – Vol. 80. – № 9. – P. 915-925
49. De Paoli F. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis / F. De Paoli, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi // *Circ. J.* – 2014. – Vol. 78. – № 8. – P. 1775-1781
50. Gensel J.C. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury / J. C. Gensel, B. Zhang // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1619. – P. 1-11
51. Hernandez-Munoz I. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein / I. Hernandez-Munoz, P. de la Torre, J. A. Sanchez-Alcazar, I. Garcia, E. Santiago, et al. // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 113. – № 2. – P. 625–640
52. Newby A.C. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction / A. C. Newby // *Exp. Physiol.* – 2016. – Vol. 101. - № 11. – P. 1327-1337
53. Robertson H. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. / H. Robertson, J. A. Kirby, W. W.

- Yip, D. E. Jones, A. D. Burt // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45. – № 4. – P. 977-981
54. Ogle M.E. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design / M. E. Ogle, C. E. Segar, S. Sridhar, E. A. Botchwey // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2016. – Vol. 241. – № 10. – P. 1084-1097
 55. Bosschaerts T. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling / T. Bosschaerts, M. Guillems, B. Stijlemans, Y. Morias, D. Engel, F. Tacke, M. Hérin, P. De Baetselier, A. Beschin // *PLoS pathogens*. – 2010. – Vol. 6. – № 8. – P. e1001045
 56. Nathan C. Nonresolving inflammation / C. Nathan, A. Ding // *Cell*. – 2010. – № 140. – P. 871–882
 57. Sindrilaru A. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice / A. Sindrilaru, T. Peters, S. Wieschalka, C. Baican, A. Baican, H. Peter, A. Hainzl, S. Schatz, Y. Qi, A. Schlecht, J.M. Weiss, M. Wlaschek, C. Sunderkötter, K. Scharffetter-Kochanek // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121. – № 3. – P. 985–997
 58. Murphy C.A. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation / C.A. Murphy, C.L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R.A. Kastelein, J.D. Sedgwick, D.J. Cua // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198. – № 12. – P. 1951–1957
 59. Smith A.M. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease / A.M. Smith, F.Z. Rahman, B. Hayee, S.J. Graham, D.J. Marks, G.W. Sewell, C.D. Palmer, J. Wilde, B.M. Foxwell, I.S. Gloger, T. Sweeting, M. Marsh, A.P. Walker, S.L. Bloom, A.W. Segal // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206. – № 10. – P. 1883–1897

60. Kawane K. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages / K. Kawane, M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa, S. Nagata // *Nature*. – 2006. – Vol. 443. – № 7114. – P. 998–1002
61. Nardin A. Macrophages and cancer / A. Nardin, J.P. Abastado // *Front. Biosci.* – 2008. – № 13. – P. 3494–3505
62. Biswas S.K. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm / S.K. Biswas, A. Mantovani // *Nature Immunol.* – 2010. – № 11. – P. 889–896
63. Barron L. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages / L. Barron, T.A. Wynn // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2011. – Vol. 300. – № 5. – P. G723–G728
64. Imai T. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine / T. Imai, M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P.W. Gray, K. Matsushima, O. Yoshie // *Int. Immunol.* – 1999. – № 11. – P. 81–88
65. Anthony R.M. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites / R.M. Anthony, J.F. Urban, F. Alem, H.A. Hamed, C.T. Roza, J.L. Boucher, N. Van Rooijen, W.C. Gause // *Nature medicine*. – Vol. 12. – № 8. – P. 955–960
66. Bhatia S. Rapid host defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype / S. Bhatia, M. Fei, M. Yarlagaadda, Z. Qi, S. Akira, S. Saijo, Y. Iwakura, N. van Rooijen, G.A. Gibson, C.M. St Croix, A. Ray, P. Ray // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. e15943
67. Prasse A. IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients / A. Prasse, M. Germann, D.V. Pechkovsky, A. Markert, T. Verres, M. Stahl, I. Melchers, W. Luttmann,

- J. Müller-Quernheim, G. Zissel // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 119. – № 2. – P. 464-471
68. Lumeng C.N. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization / C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117. – P. 175–184
 69. Vandanmagsar B. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance / B. Vandanmagsar, Y.H. Youm, A. Ravussin, J.E. Galgani, K. Stadler, R.L. Mynatt, E. Ravussin, J.M. Stephens, V.D. Dixit // Nat Med. – 2011. – Vol. 17. – № 2. – P. 179-188
 70. Li A.C. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention / A.C. Li, C.K. Glass // Nature Med. – 2002. – № 8. – P. 1235–1242
 71. Febbraio M. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism / M. Febbraio, D.P. Hajjar, R.L. Silverstein // J. Clin. Invest. – 2001. – № 108. – P. 785–791
 72. Acton S. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor / S. Acton, A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs, M. Krieger // Science. – 1996. – Vol. 271. – № 5248. – P. 518-520
 73. Pinderski L.J. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes / L.J. Pinderski, M.P. Fischbein, G. Subbanagounder, M.C. Fishbein, N. Kubo, H. Cheroutre, L.K. Curtiss, J.A. Berliner, W.A. Boisvert // Circ Res. – 2002. – Vol. 90. – № 10. – P. 1064-1071
 74. Ito I. The Polarization of M2b Monocytes in Cultures of Burn Patient Peripheral CD14⁺ Cells Treated with a Selected Human CCL1 Antisense Oligodeoxynucleotide / I. Ito, K. K. Bhopale, T. Nishiguchi, J. O. Lee, D. N. Herndon // Nucleic Acid Ther. – 2016. – Vol. 26. – № 5. – P. 269-276
 75. Tsuchimoto Y. M2b Monocytes Provoke Bacterial Pneumonia and Gut Bacteria-Associated Sepsis in Alcoholics / Y. Tsuchimoto, A. Asai, Y. Tsuda,

- I. Ito, T. Nishiguchi, et al. // J. Immunol. – 2015. – Vol. 195. – №11. – P. 5169-5177
76. Yue Y. M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20 / Y. Yue, X. Yang, K. Feng, L. Wang, J. Hou, et al. // Int. J. Cardiol. – 2017. – Vol. 245. – P. 228-235
 77. Kisseleva T. Mechanisms of fibrogenesis / T. Kisseleva, D. A. Brenner // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2008. – Vol. 233 – № 2. – P. 109-122
 78. Bagalad B.S. Myofibroblasts: Master of disguise / B. S. Bagalad, K. P. Mohan Kumar, H. K. Puneeth // J. Oral. Maxillofac. Pathol. – 2017. – Vol. 21. – № 3. – P. 462-463
 79. Ogawa M. Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications / M. Ogawa, A. C. LaRue, C. J. Drake // Blood. – 2006. – Vol. 108 – № 9. – P. 2893-2896
 80. Hinz B. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity / B. Hinz, G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, C. Chaponnier // Mol. Biol. Cell. – 2001. – Vol. 12. – № 9. – P. 2730-2741
 81. Bataller R. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis / R. Bataller, R. F. Schwabe, Y. H. Choi, L. Yang, Y. H. Paik, et al. // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112. – № 9. – P. 1383-1394
 82. Huber S.M. Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion channels / S. M. Huber, G. S. Braun, S. Segerer, R. W. Veh, M. F. Horster // Am J Physiol Renal Physiol. – 2000. – Vol. 279. – № 1. – P. F65-76
 83. Iwano M. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis / M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, et al. // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 110. – № 3. – P. 341-350
 84. Kim K.K. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix / K. K.

- Kim, M. C. Kugler, P. J. Wolters, L. Robillard, M. G. Galvez, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – № 35. – P. 13180-13185
85. Willis B.C. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung / B. C. Willis, R. M. duBois, Z. Borok // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2006. – Vol. 3. – № 4. – P. 377-382
 86. Zeisberg M. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis / M. Zeisberg, R. Kalluri // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2004. – Vol. 82. – № 3. – P. 175-181
 87. de Jong-Hesse Y. Effect of extracellular matrix on proliferation and differentiation of porcine lens epithelial cells / Y. de Jong-Hesse, J. Kampmeier, G. K. Lang, G. E. Lang // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 243. – № 7. – P. 695-700
 88. Gaça M.D. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells / M. D. Gaça, X. Zhou, R. Issa, K. Kiriella, J. P. Iredale, et al. // *Matrix Biol.* – 2003. – Vol. 22. – № 3. – P. 229-239
 89. Maher J.J. Cell-matrix interactions in liver / J. J. Maher, D. M. Bissell // *Seminars in Cell Biology.* – 1993. – Vol. 4. – № 3. – P. 189-201
 90. Johnson A. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis / A. Johnson, L. A. DiPietro // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27. – № 10. – P. 3893-3901
 91. Wu Y.S. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing / Y. S. Wu, S. N. Chen // *Front. Pharmacol.* – 2014. – № 5. – P.1
 92. Sindrilaru A. Wound healing defect of Vav3(-/-) mice due to impaired beta(2)-integrin-dependent macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils / A. Sindrilaru, T. Peters, J. Schymeinsky, T. Oreshkova, H. L. Wang, et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113. – P. 5266–5276

93. Razzaque M.S. Fibrogenesis: cellular and molecular basis / M. S. Razzaque, M. El-Hallak, A. Azouz, T. Taguchi; edited by M. S. Razzaque. – Springer US, 2005. – 215 p.
94. Yagi L.H. Human fetal wound healing: a review of molecular and cellular aspects / L. H. Yagi, L. M. Watanuki, C. Isaac, et al. // *Eur. J. Plast. Surg.* – 2016. – № 39. – P. 239–246
95. Lo D.D. Scarless fetal skin wound healing update / D. D. Lo, A. S. Zimmermann, A. Nauta, M. T. Longaker, H. P. Lorenz // *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* – 2012. – Vol. 96. – № 3. – P. 237-247
96. Ulrich M.M.W. Fetal Wound Healing / M.M.W. Ulrich // *Textbook on Scar Management* / L. Téot, T.A. Mustoe, E. Middelkoop, G.G. Gauglitz. – Cham, Switzerland: Springer, 2020. – P. 3-9
97. Carre A.L. Interaction of wingless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts / A. L. Carre, A. W. James, L. MacLeod, W. Kong, K. Kawai, et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2010. – Vol. 125. – № 1. – P. 74-88
98. Carthy J. M. Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF- β signaling through SMAD2 in a β -catenin-dependent manner / J. M. Carthy, F. S. Garmaroudi, Z. Luo, B. M. McManus // *PLoS One.* – 2011 – Vol. 6 – № 5. – P. e19809
99. Lee Y.S. Wound healing in development / Y. S. Lee, A. Wysocki, D. Warburton, T. L. Tuan // *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* – 2012. – Vol. 96. – № 3. – P. 213-222
100. Lenselink E.A. Role of fibronectin in normal wound healing / E. A. Lenselink // *Int. Wound J.* – 2015. – Vol. 12 – № 3. – P. 313-316
101. Mast B.A. Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration / B. A. Mast, L. C. Flood, J. H. Haynes, R. L. DePalma, I. K. Cohen, et al. // *Matrix.* – 1991. – Vol. 11. – № 1. – P. 63-68

102. Helmo F.R. Fetal wound healing biomarkers / F. R. Helmo, J. R. Machado, C. S. Guimarães, P. Teixeira Vde, M. A. dos Reis, R. R. Corrêa // *Dis. Markers*. – 2013. – Vol. 35. – № 6. – P. 939-944
103. Wang Z.L. Collagen-binding heat shock protein HSP47 expression during healing of fetal skin wounds / Z. L. Wang, T. Inokuchi, H. Ikeda, T. T. Baba, M. Uehara, et al. // *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* – 2002. – Vol. 31 – № 2. – P. 179-184
104. Glim J.E. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts / J. E. Glim, F. B. Niessen, V. Everts, M. van Egmond, R. H. Beelen // *Immunobiology*. – 2013. – Vol. 218 – № 6. – P. 924-929
105. Ramachandran P. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution / P. Ramachandran, J. P. Iredale // *QJM*. – 2012. – Vol. 105. – № 9. – P. 813-817
106. Sun M. Reversibility of liver fibrosis / M. Sun, T. Kisseleva // *Clin. Res. Hepatology and Gastroenterology* – 2015. – Vol. 39. – № Suppl 1(0 1). – P. S60–S63.
107. Godwin J. W. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration / J. W. Godwin, A. R. Pinto, N. A. Rosenthal // *PNAS*. – 2013. – Vol. 110. – № 23. – P. 9415-9420.
108. Goren I. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes / I. Goren, N. Allmann, N. Yogev, C. Schürmann, A. Linke, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 175. – №1. – P. 132-147
109. Duffield J.S. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair / J. S. Duffield, S. J. Forbes, C. M. Constandinou, S. Clay, M. Partolina, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – № 1. – P. 56-65

110. Gibbons M.A. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis / M. A. Gibbons, A. C. MacKinnon, P. Ramachandran, K. Dhaliwal, R. Duffin, et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 184. – № 5. – P. 569-581
111. Ko G.J. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury / G. J. Ko, C. S. Boo, S. K. Jo, W. Y. Cho, H. K. Kim // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2008. – Vol. 23. – № 3. – P. 842-852
112. Kanno Y. Alternatively activated macrophages are associated with the α 2AP production that occurs with the development of dermal fibrosis: The role of alternatively activated macrophages on the development of fibrosis / Y. Kanno, E. Shu, H. Niwa, H. Kanoh, M. Seishima // *Arthritis Res. Ther.* – 2020. – Vol. 22. – № 1. – P. 76
113. Mitchell C. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice / C. Mitchell, D. Couton, J. P. Couty, M. Anson, A. M. Crain, et al. // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 174. – № 5. – P. 1766-1775
114. Ramachandran P. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis / P. Ramachandran, A. Pellicoro, M. A. Vernon, L. Boulter, R. L. Aucott, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – №46. – P. E3186-3195
115. Shook B. CD301b+ Macrophages Are Essential for Effective Skin Wound Healing. / B. Shook, E. Xiao, Y. Kumamoto, A. Iwasaki, V. Horsley // *J. Invest. Dermatol.* – 2016. – Vol. 136. – № 9. – P. 1885-1891
116. Witherel C.E. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis / C. E. Witherel, D. Abeyayehu, T. H. Barker, K. L. Spiller // *Adv. Healthc. Mater.* – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. e1801451
117. Mirza R. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice / R. Mirza, T. J. Koh // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 56. – № 2. – P. 256-264

118. Evans BJ, Haskard DO, Sempowski G, Landis RC. Evolution of the Macrophage CD163 Phenotype and Cytokine Profiles in a Human Model of Resolving Inflammation. *Int J Inflam.* – 2013. – № 2013. – P. 780502
119. Raes G. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells / G. Raes, R. Van den Bergh, P. De Baetselier, G. H. Ghassabeh, C. Scotton, et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – № 11. – P. 6561
120. Shiratori H. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro / H. Shiratori, C. Feinweber, S. Luckhardt, B. Linke, E. Resch, et al. // *Mol. Immunol.* – 2017. – Vol. 88. – P. 58-68
121. Spiller K.L. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization / K. L. Spiller, E. A. Wrona, S. Romero-Torres, I. Pallotta, P.L. Graney, et al. // *Exp. Cell. Res.* – 2016. – Vol. 347. – № 1. – P. 1-13
122. Tedesco S. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying *in Vitro* Polarization? / S. Tedesco, F. De Majo, J. Kim, A. Trenti, L. Trevisi, et al. // *Front. Pharmacol.* – 2018. – № 9. – P. 71
123. Webster N.L. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases / N. L. Webster, S. M. Crowe // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 80. – № 5. – P. 1052-1066
124. Pardo A. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling / A. Pardo, M. Selman // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2006. – Vol. 3. – № 4. – P. 383-388
125. Iredale J.P. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis / J. P. Iredale, R. C. Benyon, M. J. Arthur, W. F. Ferris, R. Alcolado, et al. // *Hepatology.* – 1996. – Vol. 24. – № 1. – P. 176-184

126. Yoshiji H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse / H. Yoshiji, S. Kuriyama, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, et al. // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 36. – №4 Pt 1. – P. 850-860
127. Lovelock J.D. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts / J.D. Lovelock, A.H. Baker, F. Gao, J.F. Dong, A.L. Bergeron, et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – № 2. – P. H461-468
128. Lu Y. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-Akt and cell cycle progression / Y. Lu, S. Liu, S. Zhang, G. Cai, H. Jiang, et al. // *Mol. Cells*. – 2011. – Vol. 31. – № 3. – P. 225–230
129. Aristorena M. MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells / M. Aristorena, E. Gallardo-Vara, M. Vicen, M. de Las Casas-Engel, L. Ojeda-Fernandez, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – № 12. – P. 3107
130. Bar-Or A. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis / A. Bar-Or, R. K. Nuttall, M. Duddy, A. Alter, H. J. Kim, et al. // *Brain*. – 2003. – Vol. 126. – № Pt 12. – P. 2738-2749
131. Huang W.C. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B / W. C. Huang, G. B. Sala-Newby, A. Susana, J. L. Johnson, A. C. Newby // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e42507
132. Jager N.A. Distribution of Matrix Metalloproteinases in Human Atherosclerotic Carotid Plaques and Their Production by Smooth Muscle Cells and Macrophage Subsets / N. A. Jager, B. M. Wallis de Vries, J. L. Hillebrands, N. J. Harlaar, R. A. Tio, et al. // *Mol. Imaging. Biol.* – 2016. – Vol. 18. – № 2. – P. 283-291

133. Vaday G.G. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes / G. G. Vaday, H. Schor, M. A. Rahat, N. Lahat, O. Lider // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – Vol. 69. – № 4. – P. 613-621
134. Hayes E.M. Classical and Alternative Activation and Metalloproteinase Expression Occurs in Foam Cell Macrophages in Male and Female ApoE Null Mice in the Absence of T and B Lymphocytes / E. M. Hayes, A. Tsaousi, K. Di Gregoli, S. R. Jenkinson, A. R. Bond, et al. // *Front. Immunol.* – 2014. – № 5. – P. 537
135. Luzina I.G. The cytokines of pulmonary fibrosis: Much learned, much more to learn / I. G. Luzina, N. W. Todd, S. Sundararajan, S.P. Atamas // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 74. – № 1. – P. 88-100
136. Meng X.M. TGF- β : the master regulator of fibrosis / X. M. Meng, D. J. Nikolic-Paterson, H. Y. Lan // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2016. – Vol. 12. – № 6. – P.325-338
137. di Mola F.F. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease / F. F. di Mola, H. Friess, A. Scheuren, P. Di Sebastiano, H. Graber, et al. // *Ann. Surg.* – 1999. – Vol. 229. – № 1. – P. 67-75
138. Graham M.F. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells / M. F. Graham, G. R. Bryson, R. F. Diegelmann // *Gastroenterology.* – 1990. – Vol. 99. – № 2. – P. 447-453
139. Borthwick L.A. Cytokine mediated tissue fibrosis / L. A. Borthwick, T. A. Wynn, A. J. Fisher // *Biochim. Biophys. Acta.* –2013. – Vol. 1832. – № 7. – P. 1049-1060
140. Baum J. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? / J. Baum, H. S. Duffy // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 57. – № 4. – P. 376-379

141. Jun J.I. Resolution of organ fibrosis / J. I. Jun, L. F. Lau // J. Clin. Invest. – 2018. – Vol. 128. – № 1. – P. 97-107
142. Klinkhammer B.M. PDGF in organ fibrosis / B. M. Klinkhammer, J. Floege, P. Boor // Mol. Aspects Med. – 2018. – Vol. 62. – P. 44-62
143. Bonner J. C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases / J. C. Bonner // Cytokine Growth Factor Rev. – 2004. – Vol. 15 – № 4. – P. 255-273
144. Sziksz E. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family / E. Sziksz, D. Pap, R. Lippai, N. J. Béres, A. Fekete, et al. // Mediators Inflamm. – 2015. – № 2015. – P. 764641
145. Hamaguchi Y. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF-1) and IGF binding protein-3 levels in patients with systemic sclerosis: possible role in development of fibrosis / Y. Hamaguchi, M. Fujimoto, T. Matsushita, M. Hasegawa, K. Takehara, S. Sato // J. Rheumatol. – 2008. – Vol. 35. – № 12. – P. 2363-2371.
146. Hsu E. Insulin-like growth factor-II is increased in systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and contributes to the fibrotic process via Jun N-terminal kinase- and phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathways / E. Hsu, C. A. Feghali-Bostwick // Am. J. Pathol. – 2008. – Vol. 172. – № 6. – P. 1580-1590
147. Lucas T. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair / T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, et al. // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184. – №7. – P. 3964-3977
148. Hamada N. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice / N. Hamada, K. Kuwano, M. Yamada, N. Hagimoto, K. Hiasa, et al. // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. – № 2. – P.1224-1231
149. Yang L. Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Fibrosis Resolution and Repair in Mice / L. Yang, J. Kwon, Y. Popov, G.B. Gajdos, T. Ordog, et al. // Gastroenterology. – 2014. – Vol. 146. – № 5. – P. 1339–1350.e1.

150. Ueki T. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats / T. Ueki, Y. Kaneda, H. Tsutsui, K. Nakanishi, Y. Sawa, et al. // *Nat Med.* – 1999. – Vol. 5. – № 2. – P. 226-230
151. Liu Y. Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis? / Y. Liu, J. Yang // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 70. – № 2. – P. 238-240
152. Yang Y.M. TNF α in liver fibrosis / Y. M. Yang, E. Seki // *Curr. Pathobiol. Rep.* – 2015. – Vol. 3. – № 4. – P. 253–261
153. Westermann D. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy / D. Westermann, S. Linthout, S. Dhayat, N. Dhayat, A. Schmidt, et al. // *Basic Res. Cardiol.* – 2007. – Vol. 102. – № 6. – P. 500–507
154. Câmara J. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha / J. Câmara, G. Jarai // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 2
155. Liu X. Inflammatory cytokines augments TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating T β R-I / X. Liu // *Cell. Motil. Cytoskelet.* – 2008. – № 65. – P. 935–944
156. Curciarello R. The Role of Cytokines in the Fibrotic Responses in Crohn's Disease / R. Curciarello, G. H. Docena, T. T. MacDonald // *Front. Med. (Lausanne).* – 2017. – № 4. – P. 126
157. Mia M.M. Interleukin-1 β attenuates myofibroblast formation and extracellular matrix production in dermal and lung fibroblasts exposed to transforming growth factor- β 1 / M. M. Mia, M. Boersema, R. A. Bank // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. e91559
158. Redente E.F. Tumor necrosis factor- α accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages / E. F. Redente, R. C. Keith, W. Janssen, P. M. Henson, L. A. Ortiz, et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 50. – № 4. – P. 825-837

159. Lo Re S. IL-17A-producing gammadelta T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis / S. Lo Re, L. Dumoutier, I. Couillin, C. Van Vyve, Y. Yakoub, et al. // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184. – № 11. – P. 6367-6377
160. Nakashima T. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts / T. Nakashima, M. Jinnin, K. Yamane, N. Honda, I. Kajihara, et al. // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188. – № 8. – P. 3573-3583
161. Booth M. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender / M. Booth, J. K. Mwatha, S. Joseph, F. M. Jones, H. Kadzo, et al. // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172. – № 2. – P. 1295–1303
162. Cheever A.W. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis / A. W. Cheever, M. E. Williams, T. A. Wynn, F. D. Finkelman, R. A. Seder, et al. // J. Immunol. – 1994. – Vol. 153. – № 2. – P. 753-759
163. Emura M. In vitro production of B cell growth factor and B cell differentiation factor by peripheral blood mononuclear cells and bronchoalveolar lavage T lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis / M. Emura, S. Nagai, M. Takeuchi, M. Kitaichi, T. Izumi // Clin. Exp. Immunol. – 1990. – Vol. 82. – № 1. – P. 133–139
164. Wallace W.A. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA) / W. A. Wallace, E. A. Ramage, D. Lamb, S. E. Howie // Clin. Exp. Immunol. – 1995. – Vol. 101. – № 3. – P. 436–441
165. Ong C. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma / C. Ong, C. Wong, C. R. Roberts, H. S. Teh, F. R. Jirik // Eur. J. Immunol. – 1998. – Vol. 28. – № 9. – P. 2619-2629

166. Shi J. Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts / J. Shi, J. Li, H. Guan, W. Cai, X. Bai, et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e98228
167. Wang S.C. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells / S. C. Wang, M. Ohata, L. Schrum, R. A. Rippe, H. Tsukamoto // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – № 1. – P. 302-308
168. Wangoo A. Interleukin-10- and corticosteroid-induced reduction in type I procollagen in a human ex vivo scar culture / A. Wangoo, C. Laban, H. T. Cook, B. Glenville, R. J. Shaw // Int. J. Exp. Pathol. – 1997. – Vol. 78. – № 1. – P. 33-41
169. Ullm F. 3D Scaffold-Based Macrophage Fibroblast Coculture Model Reveals IL-10 Dependence of Wound Resolution Phase / F. Ullm, P. Riedl, A. M. de Amorim, A. Patzschke, R. Weiß, et al. // Advanced Biosystems. – 2019. – Vol. 4. – № 1. – P. 1900220
170. Barbarin V. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles / V. Barbarin, Z. Xing, M. Delos, D. Lison, F. Huaux // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2005. – Vol. 288. – № 5. – P. L841-848
171. Sun L. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis / L. Sun, M. C. Louie, K. M. Vannella, C. A. Wilke, A. M. LeVine, et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2011. – Vol. 300. – № 3. – P. L341-353
172. Kradin R.L. IL-10 inhibits inflammation but does not affect fibrosis in the pulmonary response to bleomycin / R. L. Kradin, H. Sakamoto, F. Jain, L. H. Zhao, G Hymowitz, F. Preffer // Exp. Mol. Pathol. – 2004. – Vol. 76. – № 3. – P. 205-211
173. Ricard-Blum S. The collagen family / S. Ricard-Blum // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – Vol. 3. – № 1. – P. a004978

174. Myllyharju J. Collagens and collagen-related diseases / J. Myllyharju, K. I. Kivirikko // *Ann. Med.* – 2001. – Vol. 33. – № 1. – P. 7-21
175. Shoulders M.D. Interstrand dipole-dipole interactions can stabilize the collagen triple helix / M. D. Shoulders, R. T. Raines // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. - № 26. – P. 22905-22912
176. Shoulders M.D. Collagen structure and stability / M. D. Shoulders, R.T. Raines // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – № 78. – P. 929-958
177. Eyden B. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy / B. Eyden, M. Tzaphlidou // *Micron.* – 2001. – Vol. 32. – № 3. – P. 287-300
178. Hosper N.A. Epithelial-to-mesenchymal transition in fibrosis: collagen type I expression is highly upregulated after EMT, but does not contribute to collagen deposition / N. A. Hosper, P. P. van den Berg, S. de Rond, E. R. Popa, M. J. Wilmer, et al. // *Exp Cell Res.* – 2013. – Vol. 319. – № 19. – P. 3000-3009
179. Specks U, Nerlich A, Colby TV, Wiest I, Timpl R. Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis / Specks U, Nerlich A, Colby TV, Wiest I, Timpl R. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1995. – Vol. 151. – № 6. – P. 1956-1964
180. Weitkamp B. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque / B. Weitkamp, P. Cullen, G. Plenz, H. Robenek, J. Rauterberg // *FASEB J.* – 1999. – Vol. 13. – № 11. – P. 1445-1457
181. Simões F.C. Macrophages directly contribute collagen to scar formation during zebrafish heart regeneration and mouse heart repair / F. C. Simões, T. J. Cahill, A. Kenyon, D. Gavriouchkina, J. M. Vieira, et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 600
182. Uceró Á.C. Collagen VI-producing macrophages mediate lung fibrosis / Á. C. Uceró, L. Bakiri, E. Wagner // *Eur. Res. J.* – 2019. – Vol. 54. – № suppl 63. – P. PA3862.

183. Ucer0 A.C. Fra-2-expressing macrophages promote lung fibrosis in mice / A. C. Ucer0, L. Bakiri, B. Roediger, M. Suzuki, M. Jimenez, P. Mandal, et al. // J. Clin. Invest. – 2019. – Vol. 129. – № 8. – P. 3293-3309
184. Schnoor M. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity / M. Schnoor, P. Cullen, J. Lorkowski, K. Stolle, H. Robenek, et al. // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. – № 8. – P. 5707-5719
185. Sprangers S. Phagocytosis of Collagen Fibrils by Fibroblasts In Vivo Is Independent of the uPARAP/Endo180 Receptor / S. Sprangers, N. Behrendt, L. Engelholm, Y. Cao, V. Everts // J. Cell. Biochem. – 2017. – Vol. 118. – № 6. – P. 1590-1595
186. Glasser S.W. Mechanisms of Lung Fibrosis Resolution / S. W. Glasser, J. S. Hagood, S. Wong, C. A. Taype, S. K. Madala, W. D. Hardie // Am. J. Pathol. – 2016. – Vol. 186. – № 5. – P. 1066-1077
187. Napper C.E. Collagen binding by the mannose receptor mediated through the fibronectin type II domain / C. E. Napper, K. Drickamer, M. E. Taylor // Biochem. J. – 2006. – Vol. 395. – № 3. – P. 579-586
188. Madsen D.H. The non-phagocytic route of collagen uptake: a distinct degradation pathway / D. H. Madsen, S. Ingvarsen, H. J. Jürgensen, M. C. Melander, L. Kjøller, et al. // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – № 30. – P. 26996-27010
189. Atabai K. Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages / K. Atabai, S. Jame, N. Azhar, A. Kuo, M. Lam, et al. // J. Clin. Invest. – 2009. – Vol. 119. – № 12. – P. 3713-3722
190. Madsen D.H. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway / D. H. Madsen, D. Leonard, A. Masedunskas, A. Moyer, H. J. Jürgensen, et al. // J. Cell. Biol. – 2013. – Vol. 202. – № 6. – P. 951-966

191. López-Guisa J.M. Mannose receptor 2 attenuates renal fibrosis / J. M. López-Guisa, X. Cai, S. J. Collins, I. Yamaguchi, D. M. Okamura, et al. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2012. – Vol. 23. – № 2. – P. 236-251
192. Song E. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts / E. Song, N. Ouyang, M. Hörbelt, B. Antus, M. Wang, M.S. Exton // Cell. Immunol. – 2000. – Vol. 204. – № 1. – P. 19-28
193. Zhu Z. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts / Z. Zhu, J. Ding, Z. Ma, T. Iwashina, E.E. Tredget // Wound Repair Regen. – 2017. – Vol. 25. – № 3. – P. 377-388
194. Ploeger D.T. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts / D. T. Ploeger, N. A. Hosper, M. Schipper, J. A. Koerts, S. de Rond, et al. // Cell. Commun. Signal. – 2013. – Vol. 11. – № 1. – P. 29
195. Nacu N. Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts / N. Nacu, I. G. Luzina, K. Highsmith, V. Lockett, K. Pochetuen, et al. // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180. – № 7. – P. 5036-5044
196. Kim Y.B. Interaction of macrophages with apoptotic cells inhibits transdifferentiation and invasion of lung fibroblasts / Y. B. Kim, Y. S. Yoon, Y. H. Choi, E. M. Park, J. L. Kang // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – № 68. – P. 112297-112312
197. Hou J. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis / J. Hou, J. Shi, L. Chen, et al. // Cell. Commun. Signal – 2018. – № 16. – P. 89
198. Sheng J. M2 macrophage-mediated interleukin-4 signalling induces myofibroblast phenotype during the progression of benign prostatic hyperplasia / J. Sheng, Y. Yang, Y. Cui, et al. // Cell. Death Dis. – 2018. – № 9. – P. 755

199. Yang I.H. Macrophages promote a profibrotic phenotype in orbital fibroblasts through increased hyaluronic acid production and cell contractility / I. H. Yang, G. E. Rose, D. G. Ezra, et al. // *Sci. Rep.* – 2019. – № 9. – P. 9622
200. Wang L. Induction of secondary apoptosis, inflammation, and lung fibrosis after intratracheal instillation of apoptotic cells in rats / L. Wang, J. F. Scabilloni, J. M. Antonini, Y. Rojanasakul, V. Castranova, R. R. Mercer // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2006. – № 290. – P. L695–L702.
201. Baranyi U. Primary Human Fibroblasts in Culture Switch to a Myofibroblast-Like Phenotype Independently of TGF Beta / U. Baranyi, B. Winter, A. Gugerell, B. Hegedus, C. Brostjan, et al. // *Cells.* – 2019. – Vol.8. – № 7. – P. 721
202. Gharib S.A. Transcriptional and functional diversity of human macrophage repolarization / S. A. Gharib, R. S. McMahan, W. E. Eddy, M. E. Long, W. C. Parks, M. L. Aitken, A. M. Manicone // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2019. – Vol. 143. – № 4. – P. 1536-1548
203. Rey-Giraud F. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions / F. Rey-Giraud, M. Hafner, C. H. Ries // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e42656
204. Vogel D.Y. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared / D. Y. Vogel, J. E. Glim, A. W. Stavenhuter, M. Breur, P. Heijnen, et al. // *Immunobiology.* – 2014. – Vol. 219. – № 9. – P. 695-703
205. Müller S. The endolysosomal cysteine cathepsins L and K are involved in macrophage-mediated clearance of *Staphylococcus aureus* and the concomitant cytokine induction / S. Müller, A. Faulhaber, C. Sieber, D. Pfeifer, T. Hochberg, et al. // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28. – № 1. – P. 162-175
206. Nepal R.M. Cathepsin L maturation and activity is impaired in macrophages harboring *M. avium* and *M. tuberculosis* / R. M. Nepal, S. Mampe, B. Shaffer,

- A. H. Erickson, P. Bryant // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 18. – № 6. – P. 931-939
207. Ghorpade A. Mononuclear phagocyte differentiation, activation, and viral infection regulate matrix metalloproteinase expression: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia / A. Ghorpade, R. Persidskaia, R. Suryadevara, M. Che, X. Liu, Y. Persidsky, et al. // *J. Virol.* – 2001. – № 75. – P. 6572– 6583
208. Hyc A. Influence of LPS, TNF, TGF- β 1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated in vitro / A. Hyc, A. Osiecka-Iwan, J. Niderla-Bielinska, S. Moskalewski // *Int. J. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 27. – № 1. – P. 127-137
209. Lacraz S. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes / S. Lacraz, L. P. Nicod, R. Chicheportiche, H. G. Welgus, J. M. Dayer // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 96. – № 5. – P. 2304-2310
210. Zhang Y. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms / Y. Zhang, K. McCluskey, K. Fujii, L. M. Wahl // *J. Immunol.* – 1998. – № 161 – P. 3071– 3076