

На правах рукописи



Максимова Александра Александровна

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

14.03.09 — Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2021

*Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и
клинической иммунологии»*

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Шевела Екатерина Яковлевна

Официальные оппоненты:

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

Логашенко Евгения Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Макрофаги (Мф) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, обладающих выраженной пластичностью, т.е. способностью менять свой функциональный фенотип в ответ на различные сигналы микроокружения [Huang X., et al., 2018]. Моноциты человека дифференцируются в М1- и М2-подобные Мф в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) или макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), соответственно. Однако фенотип макрофагов зависит не только от дифференцировочного стимула, но и от дальнейших активирующих/поляризующих сигналов. Поэтому Мф, дифференцированные M-CSF (про-М2) или GM-CSF (про-М1), могут поляризоваться и в М1, и в М2 направлении, с формированием различных функциональных фенотипов: М1 – под влиянием IFN γ и/или липополисахарида (LPS), М2а – под влиянием IL-4 и IL-13, М2b – LPS в комбинации с иммунными комплексами, М2с – IL-10, трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и глюкокортикоидов и М2d – IL-6 в комбинации с аденозином [Jaguin M., 2013; Waldo S.W., 2008]. Одним из сигналов, способствующих поляризации Мф в М2 направлении, является взаимодействие моноцитов с апоптотическими клетками, или эффероцитоз [Sakhno L.V., 2016]. Несмотря на большое количество исследований, идентификация различных подтипов Мф у человека представляет сложный вопрос в силу отсутствия специфических маркеров [Beyer M., 2012]. Кроме того, в подавляющем большинстве работ исследователи ограничиваются изучением М1 и М2а подтипов, в то время как другие функциональные фенотипы Мф охарактеризованы неполно.

Благодаря гетерогенности и пластичности, т.е. способности «переключаться» с одного функционального фенотипа на другой, Мф могут регулировать в организме различные процессы – воспаление, репарацию, ремоделирование, в том числе, развитие и прогрессирование фиброза [Wynn T.A., 2016].

Фибротические процессы являются частью патогенеза множества патологических состояний, включая цирроз печени, идиопатический фиброз легких, фиброз почек, а также фибротические осложнения новой 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 (МиоФб) белков внеклеточного матрикса (ВКМ), однако в настоящий момент такой подход не позволяет достичь значимого терапевтического эффекта [Adhyatmika A., 2015]. Более перспективное решение данной проблемы связывают с развитием подходов, направленных на стимуляцию клеток, ответственных за деградацию и захват компонентов ВКМ [Adhyatmika A., 2015], в частности, определенных типов Мф. Действительно, показано, что Мф М2а фенотипа усиливают дифференцировку фибробластов (Фб) в МиоФб и продукцию ВКМ [Wermuth P.J., 2015], в то время как М2с Мф могут проявлять антифиброгенные свойства и ограничивать фиброз [Sindrilaru A., 2013]. 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, в которых продемонстрирован *in vitro* профиброгенный потенциал М2а и антифиброгенный – М1 Мф человека. В то же время фиброгенный потенциал Мф, которые формируются в результате эффероцитоза,

ранее не изучался, хотя известно, что апоптоз является неотъемлемой частью фиброгенеза. Более того, предполагают, что Мф человека могут принимать более сложное участие в регуляции фибротического процесса, и разные подтипы Мф могут играть различную роль на определенном этапе фиброза [Hesketh M., 2017]. Наконец, недостаточно исследованы механизмы реализации про/антифиброгенной активности Мф. Таким образом, изучение влияния различных функциональных фенотипов Мф человека, генерированных из моноцитов периферической крови, на функциональную активность Фб представляется, несомненно, актуальным.

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы 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 (M-CSF/GM-CSF). Впервые показано, что Мф M2 фенотипа независимо от дифференцировочного (M-CSF/GM-CSF) и поляризующего (IL-4, дексаметазон (Dex), эффероцитоз) стимула отличаются от оппозиционного 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 (M-CSF/GM-CSF). Продemonстрировано, что среди M-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 НИИФКИ.

Работа проводилась на базе лаборатории клеточной иммунотерапии НИИФКИ. 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 секретомы» (№ 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Генерация макрофагов

В исследование были включены условно здоровые доноры обоего пола 21-54 лет. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) (20 минут, 3000 об/мин) 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) 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. По окончании срока культивирования (7 дней) Мф получали при помощи механической диссоциации. Супернатанты собирали, центрифугировали, криоконсервировали и хранили при температуре -80°C.

В отдельной серии экспериментов для анализа концентрации цитокинов 7-дневные M-CSF- и GM-CSF-дифференцированные M1(IFN γ), 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 .

Линия фибробластов

Источником Фб служили линия дермальных Фб ожогового больного NAF1, которая была любезно предоставлена ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Для исследования функциональной активности Фб клетки линии NAF1 культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в кондиционной среде (КС) Мф в течение 24 ч, а затем в бессывороточной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) в течение 3-5 дней.

Аллостимуляторная активность

Для определения аллостимуляторной активности МНК (1×10^5 лунку) культивировали в 96-луночном планшете в RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной сыворотки доноров (AB(IV) группы), в отсутствие (контроль) или присутствии различных типов 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). Аллостимуляторная активность Мф выражалась в виде индекса стимуляции (ИС) (отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК).

Пролиферация фибробластов

Пролиферативный ответ клеток линии NAF1 определяли радиометрическим методом. Для этого Фб культивировали в 96-луночном 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).

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, TGF- β 1, MMP-9, TIMP-1 и катепсина L в супернатантах 7-дневных культур Мф оценивали с помощью иммуноферментного анализа с использованием соответствующих 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 инструкцией.

Уровень продукции коллагена I типа определяли в 7-суточных супернатантах Мф и супернатантах Фб, 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.

Проточная цитометрия

Для определения фенотипа, Мф окрашивали моноклональными анти-CD86-FITC, -CD163-PerCP, -MerTK-AlexaFluor647 антителами (BD PharMingen, США). Относительное содержание клеток, экспрессирующих данные маркеры, оценивалось при помощи проточного цитометрического исследования на лазерном клеточном сортире-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы Cell Quest (Becton Dickinson, США). Степень дифференцировки дермальных Фб линии NAF1 в МиоФб оценивали по уровню внутриклеточной экспрессии альфа-гладкомышечного актина (α -SMA). С этой целью Фб пермеабилizировали (Transcription Factor Buffer Set, BD PharMingen, США) и далее инкубировали с моноклональными анти- α -SMA-APC антителами (R&D Systems, США). 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.

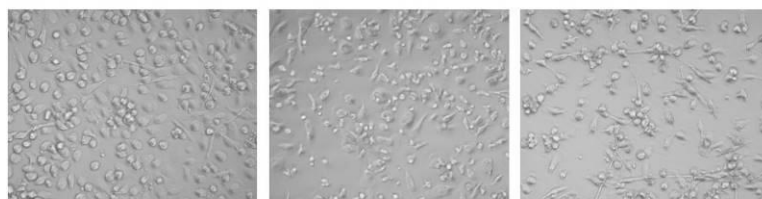
Статистическая обработка результатов

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 $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Результаты и обсуждение

Первым блоком нашего исследования являлась характеристика функциональных фенотипов Мф. Прежде всего интерес был сосредоточен на культурах, формирующихся в условиях, *in vitro* моделирующих воспаление (в присутствии GM-CSF), так как воспалительный процесс является неотъемлемой частью фиброгенеза. Данные клетки сравнивали с Мф, дифференцированными М-CSF (моделирование *in vitro* steady-state условий).

А



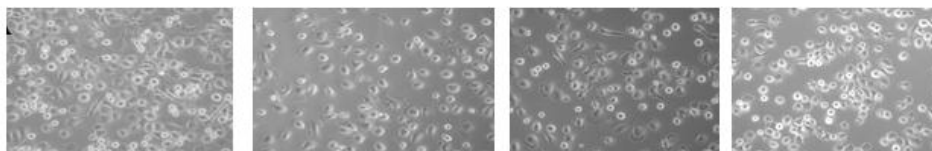
М-CSF-дифференцированные макрофаги

M1(LPS)

M2a(IL-4)

M2c(Dex)

Б



GM-CSF-дифференцированные макрофаги

M1(LPS)

M2a(IL-4)

M2c(Dex)

M2(LS)

Рисунок 1 – 7-дневные культуры М-CSF- (А) и GM-CSF- (Б) дифференцированных Мф, нативные препараты, увеличение $\times 250$. Представлены данные репрезентативного эксперимента.

В культурах М-CSF-дифференцированных Мф наблюдалось большое количество фибробластоподобных клеток, причем данная морфологическая картина была характерна для всех исследуемых подтипов. В свою очередь, GM-CSF-дифференцированные Мф содержали преимущественно клетки округлой формы с небольшим количеством фибробластоподобных клеток. Таким образом, морфология Мф определялась прежде всего дифференцировочным фактором (М-CSF vs GM-CSF) и не зависела от поляризующих стимулов, что свидетельствует о вовлеченности дифференцировочных сигналов в формирование цитоскелета Мф. Аналогичные данные были получены в работе F. Rei-Giraud и соавт., показавшими, что добавление GM-CSF в среду RPMI приводило к появлению клеток с округлой морфологией, а М-CSF – фибробластоподобных клеток [Rei-Giraud F., 2012], а также в исследовании Vogel D. и соавт. [Vogel D.Y., 2014].

Поскольку наиболее общепринятым, хотя и не лишённым недостатков, подходом к характеристике Мф является определение поверхностных и внутриклеточных маркеров, на следующем этапе функциональные фенотипы Мф характеризовали по уровню экспрессии CD86, CD163, тирозин-киназы MER (MerTK). Экспрессия CD86 является одним из характерных признаков M1 фенотипа, однако в культурах М-CSF-дифференцированных Мф при стимуляции LPS доля CD86-позитивных клеток не превышала 10% (Рисунок 2А). В свою очередь, культуры GM-CSF-дифференцированных M1(LPS) характеризовались более высоким содержанием CD86+ клеток (от 25 до 60%) по сравнению с М-CSF-дифференцированными аналогами (Рисунок 3А). Среди М-CSF-дифференцированных Мф M1(LPS) отличались от M2 более высоким содержанием CD86+ клеток (Рисунок 2А). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) превышали M1(LPS) по уровню экспрессии CD163 и MerTK, при этом культуры M2c(Dex) характеризовались наибольшим содержанием CD163+ и MerTK+ Мф (Рисунок 2Б и 2В).

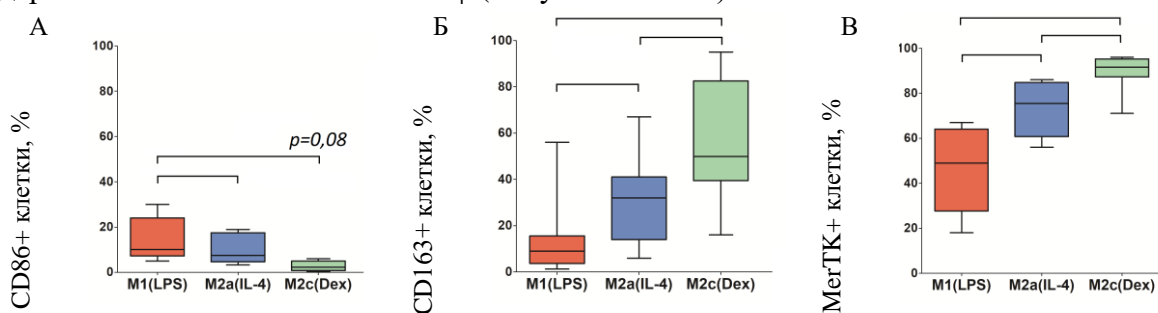


Рисунок 2 – Относительное содержание (%) CD86+ (А), CD163+ (Б), MerTK+ (В) Мф в М-CSF-дифференцированных культурах, n = 4–9, pW<0,05.

Уровень CD86+ клеток в культурах GM-CSF-дифференцированных M1(LPS) также значительно превышал содержание данных клеток в культурах Мф, поляризованных IL-4, дексаметазоном и взаимодействием с апоптотическими клетками, что подтверждало формирование M1 фенотипа (Рисунок 3А). В то же время M2a(IL-4) и M2c(Dex) значительно превышали M1(LPS) по экспрессии M2-ассоциированных маркеров - CD163 и MerTK, причем наиболее высокое содержание CD163+ и MerTK+ клеток было характерно для поляризованных дексаметазоном Мф (Рисунок 3Б и 3В). Что касается M2(LS), то они отличались от других M2 Мф достаточно высоким уровнем CD86, который тем не менее значительно не отличался от других M2 Мф, и в то же время был значительно ниже такового M1(LPS) (Рисунок 3А). При этом M2(LS), как и другие M2 клетки, активно

экспрессировали CD163 и MerTK (Рисунок 3Б и 3В). Полученные данные в целом согласуются с данными литературы [Никонова А.А., 2017; Lurier E.B. 2017; Zizzo G., 2012], в которых экспрессия CD86 признается отличительным признаком M1 фенотипа, а CD163 и MerTK – M2-ассоциированным маркером. Более высокое содержание CD86-позитивных клеток в культурах GM-CSF-дифференцированных M1(LPS) по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами свидетельствует о более эффективном формировании провоспалительного фенотипа Мф в условиях, моделирующих *in vitro* воспаление. При этом Мф M2 фенотипа эффективно генерируются как в присутствии M-CSF, так и GM-CSF.

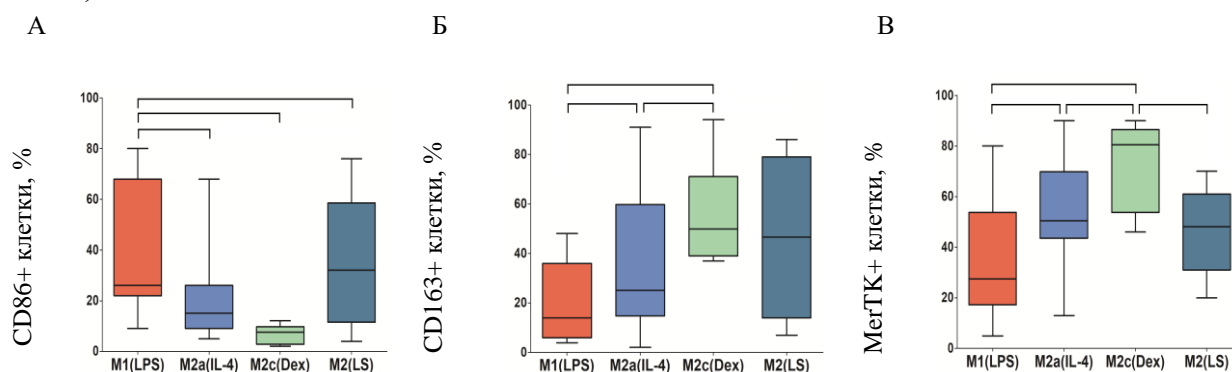


Рисунок 3 – Относительное содержание (%) CD86+ (А), CD163+ (Б) и MerTK+ (В) Мф в GM-CSF-дифференцированных культурах, n = 4–12, pW<0,05.

Цитокиновый профиль M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных культур также различался. Так, добавление GM-CSF приводило к формированию клеток, характеризующихся более высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , MIP-1 β и TNF α) по сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами (Рисунок 4). 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 Vogel D. и соавт., в котором GM-CSF-дифференцированные Мф характеризовались более выраженным уровнем TNF α и IL-6 по сравнению с Мф, индуцированными M-CSF [Vogel D.Y., 2014]. Jaguin M. и соавт. также выявили более высокий уровень продукции TNF α и IL-1 β в культурах GM-CSF-дифференцированных M1 Мф [Jaguin M., 2013]. Однако в отличие от Jaguin M. и соавт. мы не обнаружили различий в содержании IL-10 между M-CSF- и GM-CSF-дифференцированными Мф.

Что касается Мф с M1 и M2 фенотипом, то культуры M1 клеток отличались более высокой концентрацией провоспалительных цитокинов, уровень которых в большинстве случаев увеличивался при стимуляции LPS, в то время как M2a(IL-4) и M2c(Dex) характеризовались схожим цитокиновым профилем с низким содержанием провоспалительных цитокинов и относительно высоким - противовоспалительных по сравнению с M1 (Рисунок 4). В свою очередь, M2(LS) демонстрировали уникальный цитокиновый профиль, отличаясь от других M2 фенотипов меньшей продукцией IL-1 β , наряду с более активной - IL-7, IL-13, IL-17. В отсутствие LPS-сигнала культуры 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 .

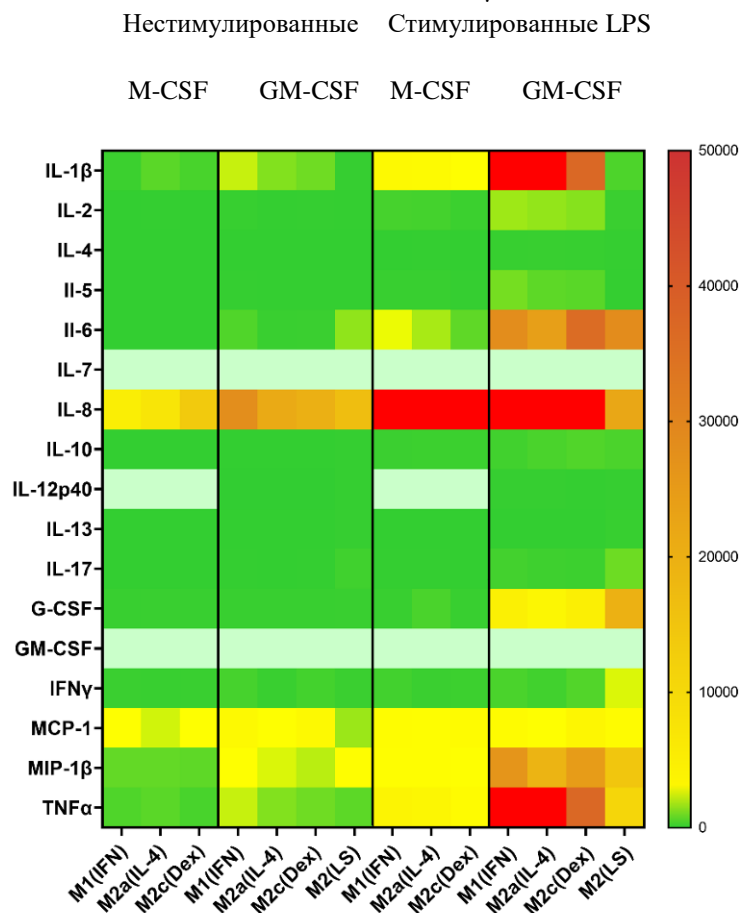


Рисунок 4 – Содержание цитокинов (пг/мл) в М- и GM-CSF-дифференцированных культурах (спонтанная продукция и стимулированная LPS). Данные представлены в виде тепловой карты медианных значений, n = 6–10.

Сложность идентификации различных популяций Мф человека заключается в отсутствии специфических маркеров. В то же время одной из задач исследования являлся поиск маркера, позволяющего дифференцировать М1 и М2 фенотипы Мф человека. Мы предположили, что таким параметром может быть аллостимуляторная активность, поскольку она является интегральным показателем, детерминированным экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости, костимуляторных и коингибиторных молекул, цитокиновым профилем, экспрессией различных ферментов, способностью индуцировать Т регуляторные клетки.

Анализ аллостимуляторной активности Мф показал, что все исследуемые типы Мф оказывали стимулирующее действие на пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ (Рисунок 5). При этом дифференцировка Мф в присутствии GM-CSF приводила к формированию Мф с более выраженной аллостимуляторной активностью, что особенно было характерно для М1(LPS) (Рисунок 5Б). Так, по сравнению с М-СФС-дифференцированными аналогами, данные клетки характеризовались значимо более высокими индексами стимуляции (9,3 vs 5,0). В то же время М2а(IL-4) и М2с(Dex) Мф характеризовались одинаково низкой аллостимуляторной активностью не зависимо от типа дифференцировочного фактора (Рисунок 5А и 5Б). М2(LS) клетки, как и другие М2, проявляли невысокий

стимулирующий эффект (Рисунок 5Б). Таким образом, все исследуемые типы Мф проявляли аллостимуляторную активность, выраженность которой определялась поляризующими стимулами, причем стимулирующий эффект LPS – в отличие от других поляризующих сигналов – был взаимосвязан с дифференцировочным фактором.

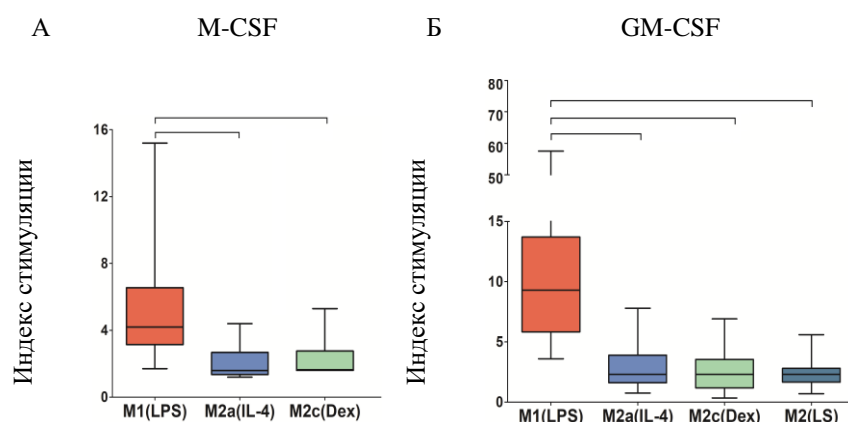


Рисунок 5 – Аллостимуляторная активность Мф, дифференцированных М-CSF (А, n=7–10) и GM-CSF (Б, n=15–41), $pW < 0.05$.

Проведенный ROC-анализ продемонстрировал, что аллостимуляторная активность в качестве диагностического теста для идентификации М1/М2 Мф характеризовалась высокой точностью, чувствительностью и специфичностью как для М-, так и для GM-CSF-дифференцированных клеток (Рисунок 6). Эти данные позволили нам заключить, что аллостимуляторная активность является универсальной характеристикой, позволяющей идентифицировать оппозитные М1/М2 фенотипы, и использовать определение аллостимуляторной активности для контроля генерируемых клеток.

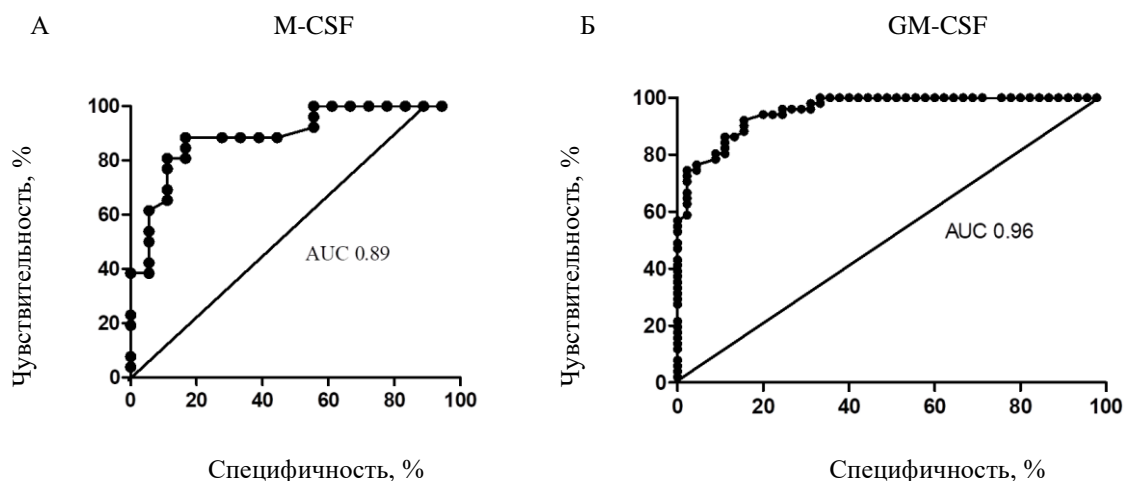


Рисунок 6 – ROC-кривая, иллюстрирующая отношение между чувствительностью и специфичностью для различных точек разделения индекса стимуляции М1 и М2 М-CSF- (А) GM-CSF- (Б) дифференцированных Мф в СКЛ.

Вторым блоком нашего исследования был анализ фибромодулирующих эффектов Мф. Данные клетки могут регулировать фиброгенез различными способами: непосредственно воздействуя на процесс синтеза/деградации ВКМ, либо опосредованно - через регуляцию активности Фб.

Первоначально мы исследовали эффекты Мф, генерированных в «steady-state» состоянии (т.е. в присутствии М-CSF) на ВКМ. Оказалось, что М-CSF-дифференцированные Мф обладали способностью самостоятельно продуцировать компоненты ВКМ, в частности, коллаген 1 типа. Мф секретировали коллаген на хорошо детектируемом уровне, который, однако, не зависел от используемых поляризующих стимулов (LPS, IL-4, Dex) (Рисунок 7).

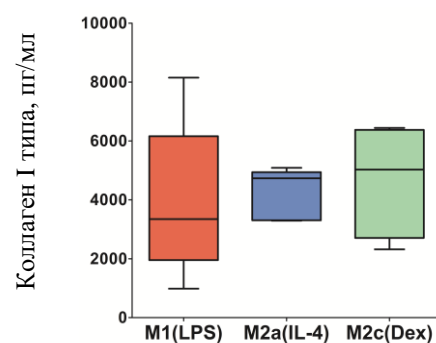


Рисунок 7 – Продукция коллагена I типа М-CSF-дифференцированными Мф, n=6.

Во-вторых, М-CSF-дифференцированные Мф продуцировали протеазы ВКМ. При этом в присутствии противовоспалительных сигналов концентрация MMP-9 была выше по сравнению с M1(LPS), однако эти различия не были значимыми (Рисунок 8А). Что касается TIMP-1, то дифференцировка Мф в присутствии М-CSF приводила к генерации Мф, которые слабо продуцировали TIMP-1 (на нижнем уровне чувствительности метода, <80 пг/мл) (Рисунок 8Б), что может быть связано с тем, что TIMP-1 у человека является индуцибельным ингибитором [Ghorpade A., 2007]. 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, не экспрессировали мРНК TIMP-1 [Hayes E.M., 2014].

Поскольку в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани важную роль играет баланс MMP и TIMP, далее было проанализировано соотношение MMP-9/TIMP-1. Так как М-CSF-дифференцированные Мф отличались низкой TIMP-1-продуцирующей активностью, для всех исследуемых функциональных фенотипов был характерен высокий индекс соотношения MMP-9/TIMP-1 (Рисунок 8В).

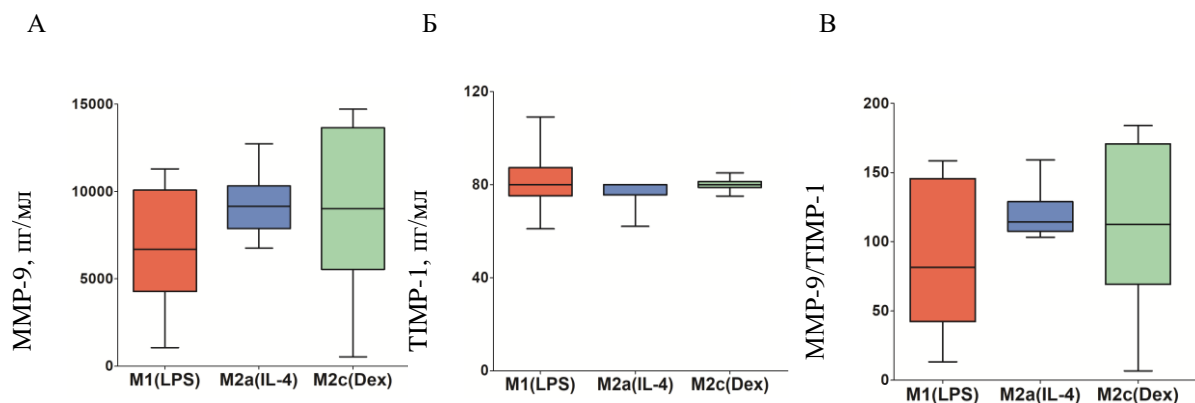


Рисунок 8 – Продукция MMP-9 (А), TIMP-1 (Б) и индексы соотношения MMP-9/TIMP-1 (В) М-CSF-дифференцированными Мф, данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и min-max, n=6.

Продуцируя растворимые факторы, Мф способны оказывать модулирующее влияние на функциональную активность Фб – центральных клеток фиброгенеза, ответственных за синтез и отложение ВКМ. 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) (Рисунок 9). Что касается Мф с М2 фенотипом, то КС М2а(IL-4) и М2с(Dex) не различались по степени влияния на пролиферативный ответ Фб.

Дифференцировка Фб в МиоФб, благодаря которой клетки приобретают сократительную активность, подвижность и характеризуются активной продукцией компонентов ВКМ, является одним из ключевых моментов фиброгенеза. TGF- β 1 является основным ростовым фактором, стимулирующим этот процесс, поэтому по уровню продукции данного фактора можно косвенно

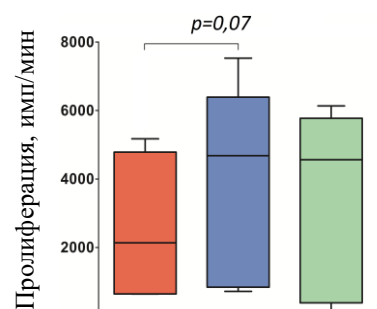


Рисунок 9 – Пролиферативный ответ дермальных Фб в присутствии КС М-CSF-дифференцированных Мф, n=4.

судить о способности Мф активировать Фб. Из Рисунка 10 видно, что М-CSF-дифференцированные Мф, поляризованные в присутствии LPS, характеризовались более низким

уровнем продукции TGF- β 1 по сравнению с М2 клетками (2137 пг/мл vs 4680 и 4564 пг/мл, соответственно), однако различия на уровне тренда обнаруживались только с М2а(IL-4). В свою очередь, М2а(IL-4) и М2с(Dex) значимо не различались между собой по продукции данного фактора.

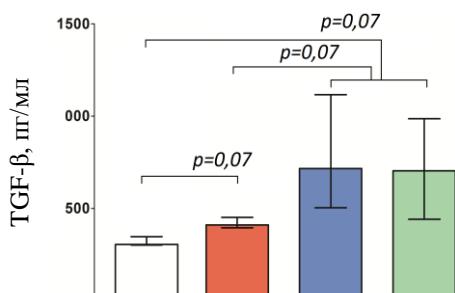


Рисунок 10 – Продукция TGF- β 1 М-CSF-дифференцированными Мф, n=4–5.

Таким образом, несмотря на тенденцию к более выраженному стимулирующему влиянию Мф с М2 фенотипом (по сравнению с М1) на пролиферацию Фб и продукцию TGF- β 1, мы не выявили значительных различий между эффектами различных функциональных фенотипов Мф на фиброгенез в условиях «steady-state». 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 Фб разными фенотипами Мф.

GM-CSF-дифференцированные Мф продуцировали коллаген на хорошо детектируемом уровне (Рисунок 11), при этом всем функциональным фенотипам, за исключением М2с(Dex), в целом был присущ значимо более высокий уровень продукции коллагена I типа сравнению с клетками, индуцированными М-CSF. Так, содержание коллагена в культурах GM-CSF-дифференцированных М1(LPS) более чем в 2,5 раза превышало таковое в культурах М-CSF-стимулированных М1(LPS) (8127 пг/мл vs 3346 пг/мл, соответственно). Тем не менее, значимых различий с М2а(IL-4) и М2с(Dex) обнаружено не было. Среди М2 Мф наиболее выраженной коллаген-продуцирующей активностью характеризовались М2(LS) (12920 пг/мл), в культурах которых концентрация

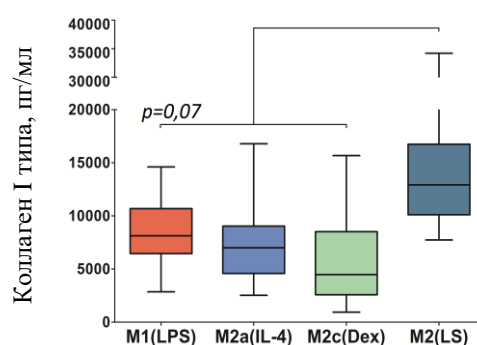


Рисунок 11 – Продукция коллагена I типа GM-CSF-дифференцированными Мф, n=6–13, pW<0,05.

коллагена значимо превышала таковую в супернатантах M2a(IL-4) и M2c(Dex) клеток, а также M1(LPS) на уровне тренда, что может отражать один из путей реализации их репаративного потенциала.

По сравнению с M-CSF-дифференцированными аналогами, уровень MMP-9 в культурах GM-CSF-дифференцированных Мф был практически в 2 раза ниже (Рисунок 12А). При этом M1(LPS) не отличались значимо от M2 Мф (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), однако значимых различий среди исследуемых фенотипов обнаружено не было.

Что касается TIMP-1, то в отличие от «steady-state» культур, GM-CSF-дифференцированные Мф активно продуцировали данный ингибитор (Рисунок 12Б). M2(LS) характеризовались наиболее высоким 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. Максимальные значения MMP-9/TIMP-1 (9,66 пг/мл) были характерны для M2c(Dex), что значимо превышало показатели M1(LPS), M2a(IL-4) (5,61 и 9,0 пг/мл, соответственно) и M2(LS) (3,28 пг/мл) (Рисунок 12В). Напротив, M2(LS) характеризовались значимо более низкими значениями MMP-9/TIMP-1 по сравнению с M2a(IL-4) и M2c(Dex).

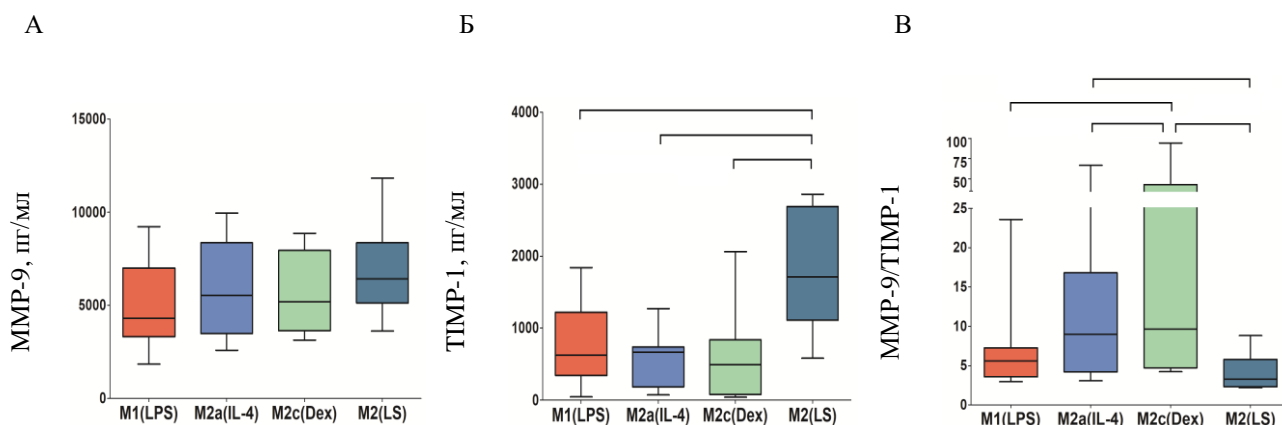


Рисунок 12 – Продукция MMP-9 (А) и TIMP-1 (Б) и индексы соотношения MMP-9/TIMP-1 (В) для GM-CSF-дифференцированных Мф, $pW < 0,05$.

Поскольку считается, что клетки с M2c фенотипом принимают активное участие в разрешении фиброза, когда деградация ВКМ преобладает над его синтезом [Adhyatmika A., 2015], 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.

Далее мы проанализировали влияние GM-CSF-дифференцированных Мф на функциональную активность Фб. Рисунок 13 демонстрирует, что все подтипы Мф стимулировали пролиферацию клеток NAF1. При этом уровень стимуляции Фб растворимыми факторами M1(LPS) был схожим с эффектами M2a(IL-4) и M2(LS). В то же время КС M2c(Dex) увеличивали пролиферативную активность Фб в 9,2 раза, что значимо превышало ИС M2a(IL-4) и M2(LS) (3,6 и 3,55, соответственно).

Анализ содержания TGF- β 1 показал, что GM-CSF-дифференцированные активно продуцировали этот фактор (Рисунок 14А). При этом концентрация TGF- β 1 в супернатантах M1(LPS) была сопоставима с его содержанием в культурах M2a(IL-4) и M2c(Dex) (4710, 4872 и 4124 пг/мл, соответственно). Отличительной особенностью M2(LS) оказался высокий уровень продукции TGF- β 1 (9222 пг/мл), который значимо отличался от M2a(IL-4) и M2c(Dex) и на уровне тренда - от M1(LPS).

Мы оценили также концентрацию ангиогенина и VEGF – факторов, обладающих модулирующим влиянием на функциональную активность Фб (Рисунок 14Б и 14В). Среди всех GM-CSF-дифференцированных Мф наиболее высокий уровень продукции VEGF демонстрировали M2a(IL-4) (2872 пг/мл) и M2(LS) (2643 пг/мл), что более чем в 3 раза превышало уровень фактора в культурах M1(LPS) (813 пг/мл) и в 2 раза - M2c(Dex) (1602 пг/мл) (Рисунок 14В).

По продукции ангиогенина M1(LPS) отличались более высоким уровнем 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 (Рисунок 14В). Что касается M2 культур, то наибольший интерес представляли M2(LS), содержание ангиогенина в супернатантах которых было выше более чем в 2,7 раза больше по сравнению с M1 и M2 Мф, достигая 4730 пг/мл.

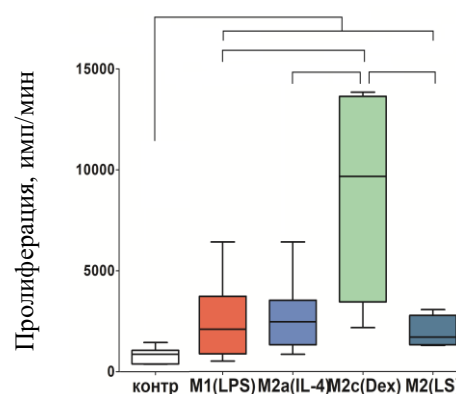


Рисунок 13 – Проллиферативный ответ дермальных Фб в присутствии КС GM-CSF-дифференцированных Мф, $n=5-12$, $pW<0,05$.

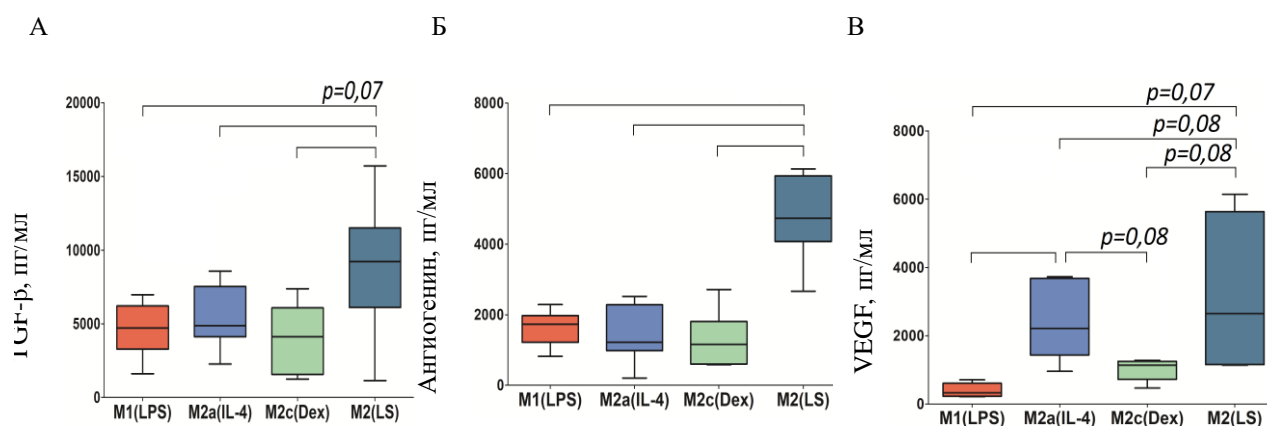


Рисунок 14 – Продукция TGF- β 1 ($n=6-8$), ангиогенина ($n=7$), VEGF ($n=5$) GM-CSF-дифференцированными Мф, $pW<0,05$.

Поскольку функциональные фенотипы Мф различались по продукции ростовых факторов, далее мы проанализировали влияние КС Мф на дифференцировку Фб по экспрессии α -SMA, как наиболее общепринятого маркера для идентификации МиоФб (Рисунок 15).

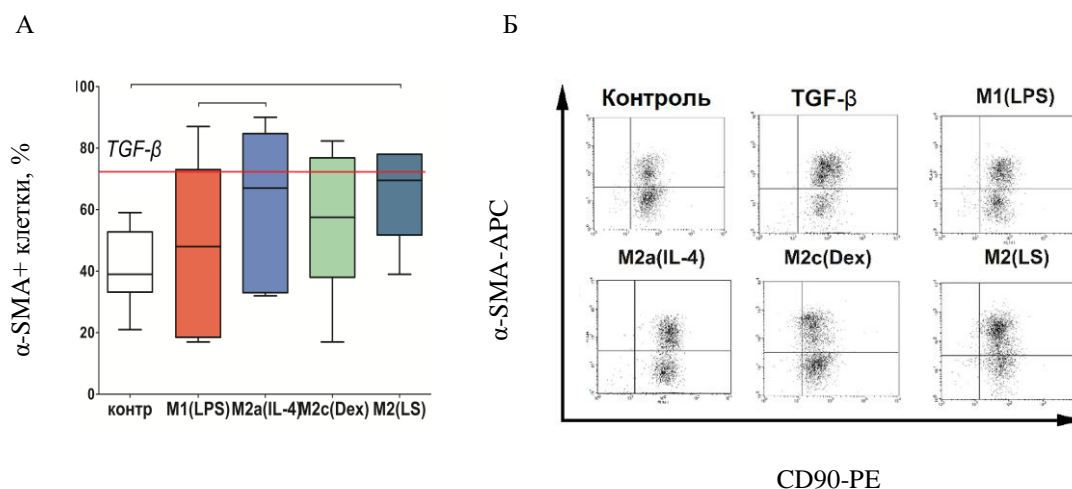


Рисунок 15 – Относительное содержание α -SMA-позитивных клеток в культурах Фб, обработанных КС GM-CSF-дифференцированных Мф (А, n=6–10) и цитометрические данные репрезентативного эксперимента (Б). Красной линией обозначен уровень TGF- β 1-индуцированного (позитивного) контроля, $p < 0,05$.

КС Мф всех типов усиливали экспрессию α -SMA на Фб. При этом стимулирующий эффект M1(LPS) (48% α -SMA+ клеток в культуре) был значительно менее выраженным по сравнению с M2a(IL-4) (67%) и TGF- β -индуцированным (позитивным) контролем (72,5%). Обработка Фб кондиционными средами Мф с M2 фенотипом сопровождалась 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 Фб в присутствии КС M2(LS) приводило к дифференцировке клеток на уровне TGF- β -индуцированного (позитивного) контроля (69,5% и 72,5%, соответственно).

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 (Рисунок 16).

Результаты исследования показали, что растворимые факторы Мф способствовали более интенсивной продукции ВКМ по сравнению с контролем, за исключением M2c(Dex). M1(LPS) менее активно стимулировали продукцию коллагена по сравнению с M2(LS), но не отличались от M2a(IL-4) и M2c(Dex). Среди M2 Мф наиболее выраженным стимулирующим эффектом отличались КС M2(LS), которые

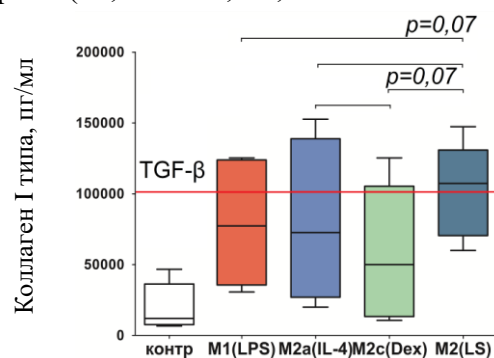


Рисунок 16 – Продукция коллагена I типа дермальными Фб, обработанными КС GM-CSF-дифференцированных Мф. Красной линией обозначен уровень TGF- β 1-индуцированного (позитивного) контроля, n=5–8, $p < 0,05$.

стимулировали продукцию коллагена на уровне TGF- β -индуцированного контроля (107,3 нг/мл и 101,3 нг/мл соответственно), значимо превышая эффекты M2a(IL-4) и M2c(Dex) на уровне тренда. Полученные результаты в целом согласуются с работой Nacu N. 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 [Nacu N., 2008]. Напротив, КС M2c(Dex) оказывали минимальное стимулирующее влияние на коллаген-продуцирующую активность Фб (концентрация коллагена 50 нг/мл), который значимо отличался от M2a(IL-4) и M2(ЛS) клеток на уровне тренда.

Стимулирующее влияние на дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность, характерное для КС M2(ЛS), может быть связано с высоким содержанием TGF- β в супернатантах. Тем не менее, по-видимому, TGF- β является не единственным фактором, опосредующим влияние Мф на экспрессию α -SMA, поскольку M1(LPS) клетки, несмотря на одинаковый уровень продукции TGF- β с M2a(IL-4), характеризовались значимо меньшим стимулирующим влиянием на дифференцировку Фб. Вероятно, это обусловлено 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 [Luzina I.G., 2015; Shi J., 2014; Wangoo A., 1997] обладают антифиброгенной активностью.

Таким образом, в условиях воспалительного дифференцировочного сигнала Мф проявляют более выраженный фиброгенный потенциал по сравнению со «steady-state» Мф, о чем свидетельствует высокий уровень продукции коллагена, TGF- β и низкий индекс соотношения MMP-9/TIMP-1. Более того, поляризованные в таких условиях Мф проявляют значительную вариабельность в свойствах в зависимости от активирующего/поляризующего стимула, что особенно заметно для клеток, формирующихся под воздействием M2-сигналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные в данной работе исследования позволяют заключить, что функциональная активность Мф в значительной мере определяется условиями дифференцировки и поляризации. При этом колониестимулирующие факторы (M-CSF или GM-CSF) определяют вектор дифференцировки, однако окончательный фенотип Мф формируется под влиянием дальнейшей активации/поляризации. Таким образом, Мф M1 и M2 фенотипов могут быть получены как в условиях M-CSF-, так и GM-CSF-опосредованной дифференцировки. Тем не менее, генерируемые фенотипы Мф характеризуются фенотипическими и функциональными особенностями.

Мф, поляризованные LPS, характеризуются активной продукцией про- и противовоспалительных факторов, относительно низким уровнем VEGF и TGF- β 1, способностью к продукции коллагена I типа, а также обладают выраженной аллостимуляторной активностью, уровень которой, как и уровень продукции коллагена, детерминируется дифференцировочными факторами (генерируемые в присутствии GM-CSF M1 клетки обладают большей аллостимуляторной активностью по сравнению с M-CSF-дифференцированными Мф).

Поляризация Мф интерлейкином-4 сопровождается формированием фенотипа (M2a) с низкой аллостимуляторной активностью, вне зависимости от типа

дифференцировочного фактора. При этом и GM- и M-CSF-дифференцированные M2a(IL-4) характеризуются выраженной продукцией IL-8, MCP-1, VEGF, MMP-9, а также продукцией коллагена I типа.

В свою очередь, обработка Мф дексаметазоном (M2c фенотип), приводит к образованию Мф с низкой аллостимуляторной активностью как в случае M-CSF-, так и GM-CSF-индуцированных клеток. При этом, несмотря на схожий с M2a(IL-4) в целом профиль секреции цитокинов, хемокинов и иных биологических агентов (коллаген I типа, MMP и TIMP), M2c(Dex) отличаются по влиянию на пролиферативный ответ Фб и продукцию ими коллагена. Так, GM-CSF-дифференцированные M2c(Dex) активно стимулируют пролиферацию дермальных Фб, проявляя при этом незначительную коллаген-стимулирующую активность.

Исследование M2 Мф, генерируемых в условиях дефицита ростовых факторов (M2(LS)), выявило уникальные свойства этой популяции Мф, отличные от других M2 фенотипов. Так, M2(LS) проявляли низкую аллостимуляторную активность, что характерно для всех Мф с M2 фенотипом, однако при этом активно секретировали ряд провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-5, IL-6 и IL-17), а также характеризовались высоким уровнем продукции TGF- β 1, TIMP-1, коллагена I типа. Кроме того, M2(LS) отличались от других фенотипов более выраженным стимулирующим влиянием на продукцию коллагена фибробластами.

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 определяется функциональным фенотипом Мф. Так, растворимые факторы M2c(Dex), дифференцированных GM-CSF, оказывали выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию Фб, в то время как M2(LS) в наибольшей степени индуцировали дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность Фб. Наряду с этим, эффекты M1(LPS) на пролиферацию и дифференцировку дермальных Фб, но не на продукцию коллагена, оказались наименее выраженными среди всех исследуемых подтипов Мф.

Поскольку значительная часть исследований проведена с использованием КС Мф, можно заключить, что секреторная активность различных подтипов Мф, определяемая сигналами микроокружения, является важным механизмом в регуляции различных процессов в организме, включая процесс фиброгенеза.

ВЫВОДЫ

1. M-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 M-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 работ, опубликованных по теме диссертации

Оригинальные статьи

- 1) **Yankovskaya A.A.** Allostimulatory activity as a criterion of the functional phenotype of human macrophages / A.A. Yankovskaya, E.Y. Shevela, L.V. Sakhno, M.A. Tikhonova, A.S. Dome, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Human Immunology. – 2019. – V.80. – №10. – P. 890-896. DOI: 10.1016/J.HUMIMM.2019.08.003
- 2) **Янковская А.А.** Сравнительная характеристика продукции MMP-9 и TIMP-1 различными подтипами макрофагов / А.А. Янковская, Л.В. Сахно, Е.Я. Шевела // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т.13(22). – №2. – С. 997-999. DOI: 10.31857/S102872210006493-7
- 3) **Максимова А.А.** Продукция факторов, участвующих в регуляции фиброза, различными типами макрофагов человека / А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно, А.А. Останин, Е.Р. Черных // Медицинская иммунология. – 2020. – Т.22. – №4. – С. 625-632. DOI: 10.15789/1563-0625-POF-1954
- 4) Sakhno L.V. Efferocytosis modulates arginase-1 and tyrosine kinase Mer expression in GM-CSF-differentiated human macrophages / L.V. Sakhno, E.Y. Shevela, M.A. Tikhonova, **A.A. Maksimova**, T.V. Tyrinova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Bull Exp Biol Med. – 2020. – Vol. 170. – №12. – P.778–781. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-12-768-771
- 5) **Maksimova A.A.** Influence of secretome of different macrophage functional phenotypes on proliferation, differentiation and collagen-producing activity of dermal fibroblasts in vitro / A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, M.A. Tikhonova, A.A. Ostanin, and E.R.

Тезисы материалов конференций

- 6) **Максимова А.А.** Влияние различных субпопуляций макрофагов человека на функции фибробластов / А.А. Максимова, Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, Е.Я Шевела // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Девятой Всероссийской научно-практической конференции 22–24 сентября 2020 г., г. Новосибирск. – 2020. – С. 90-91.
- 7) **Максимова А.А.** Разнонаправленные эффекты M1 и M2 макрофагов человека на экспрессию α -SMA дермальными миофибробластами / А.А. Максимова, Т.В. Тыринова, И.М. Ращупкин // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 19–20 ноября 2020 г. – 2020. – С. 493-495.

Патент

- 8) Пат. РФ 2717024 Способ идентификации функционального M1 и M2 фенотипа макрофагов человека, генерированных *in vitro* из моноцитов крови / Шевела Е.Я., Янковская А.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. № 2019118746, заявл. 17.06.2019; опубл. 17.03.2020, Бюл. № 8.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CD – кластер дифференцировки
Dex – дексаметазон
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IFN γ - интерферон γ
IL – интерлейкин
LPS – липополисахарид
LS – low serum, дефицит сывороточных факторов
M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор
MerTK – тирозин-киназа Mer
MMP – матричная металлопротеиназа
TGF- β – трансформирующий фактор роста β
TIMP – тканевой ингибитор металлопротеиназ
VEGF – фактора роста эндотелия сосудов
ВКМ – внеклеточный матрикс
ИС – индекс стимуляции
КС – кондиционная среда
Мф – макрофаг(и)
МиоФб – миофибробласт(ы)
СКЛ – смешанная культура лейкоцитов
Фб – фибробласт(ы)