

ПРОДУКЦИЯ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ФИБРОЗА, РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Макрофаги (Мф) играют ключевую роль в регуляции процессов фиброгенеза, включая пролиферацию фибробластов и миофибробластов, дифференцировку клеток-предшественников в миофибробласты, а также синтез и секрецию компонентов внеклеточного матрикса, преимущественно коллагена. Направленность эффектов Мф (стимуляция или подавление) определяется рядом факторов, в том числе стадией фибротического процесса и функциональным фенотипом Мф, который зависит от сигналов микроокружения. Один из возможных путей регуляции фиброгенеза заключается в секреции Мф про- или антифиброгенных факторов, включая матриксные металлопротеиназы, ингибиторы металлопротеиназ и некоторые цитокины. Однако данные о способности различных субпопуляций Мф человека секретировать эти факторы крайне немногочисленны и противоречивы. Целью настоящего исследования была характеристика способности М1, М2а и М2с Мф человека, дифференцированных в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, продуцировать матриксные металлопротеиназы (ММР-9) и их тканевые ингибиторы (ТИМР-1), а также некоторые цитокины и ростовые факторы. Показано, что по сравнению с М2-макрофагами, М1 Мф, поляризованные липополисахаридом, продуцировали значительно больше TNF α , IL-6 и IL-2, которые, помимо провоспалительной активности, обладают, как было показано, способностью инициировать фибротический процесс. В свою очередь, М2а Мф, индуцированные IL-4, характеризовались высоким уровнем продукции VEGF и при этом низким уровнем TNF α и IL-6, что может обуславливать важное участие этих клеток на пролиферативной стадии фиброза и стимулировать активное отложение внеклеточного матрикса. И наконец, М2с Мф, поляризованные в присутствии дексаметазона, характеризовались схожим с М2а Мф спектром исследуемых цитокинов и активно продуцировали VEGF на фоне низкой продукции TNF α и IL-6. При этом все три исследуемые субпопуляции Мф активно секретировали ММР-9 и ТИМР-1, не различаясь значительно между собой по уровню продукции этих факторов. Однако М2с Мф отличались значительно более высоким индексом соотношения ММР-9/ТИМР-1 по сравнению с М1 и М2а Мф, что играет решающее значение на стадии реорганизации фибротического процесса. Таким образом, продукция различными типами Мф ММР-9 и ТИМР-1, в совокупности с другими плейотропными цитокинами и ростовыми факторами, может отражать их роль в регуляции различных стадий фибротического процесса.

Ключевые слова: макрофаги, поляризация макрофагов, цитокины, матриксные металлопротеиназы, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, фиброз

Адрес для переписки:

Максимова Александра Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Address for correspondence:

Maksimova Aleksandra A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Продукция факторов,
участвующих в регуляции фиброза, различными типами
макрофагов человека» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 625-632.
doi: 10.15789/1563-0625-POF-1954
© Максимова А.А. и соавт., 2020

For citation:

A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Production of factors involved into fibrosis
regulation by various types of human macrophages", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 4, pp. 625-632.
doi: 10.15789/1563-0625-POF-1954
DOI: 10.15789/1563-0625-POF-1954

PRODUCTION OF FACTORS INVOLVED INTO FIBROSIS REGULATION BY VARIOUS TYPES OF HUMAN MACROPHAGES

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Ostanin A.A.,
Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Macrophages (M ϕ) play a key role in regulation of fibrogenesis, including proliferation of fibroblasts and myofibroblasts, differentiation of progenitor cells into myofibroblasts, as well as synthesis and secretion of the extracellular matrix, mainly collagen. The direction of the M ϕ effects (stimulation or suppression) is determined by a number of factors, including the stage of the fibrotic process and the M ϕ functional phenotype dependent on the signals of microenvironment. One of the feasible ways of the fibrogenesis regulating is the secretion of pro- or antifibrotic factors such as matrix metalloproteinases, inhibitors of metalloproteinases and some cytokines. However, existing data on ability to secrete these factors by various subpopulations of human M ϕ are rare and controversial. The aim of this study was to characterize the ability of human M1, M2a, and M2c M ϕ differentiating in the presence of GM-CSF to produce matrix metalloproteinases (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1), as well as some cytokines and growth factors. As compared to M2 macrophages, the M1 macrophages polarized by lipopolysaccharide produced significantly more TNF α , IL-6 and IL-2 that have pro-inflammatory activity and are able to initiate a fibrotic process. In turn, M2a M ϕ stimulated by IL-4 were characterized by a high level of VEGF production and, at the same time, low levels of TNF α and IL-6, which may determine the important role of these cells at the proliferative stage of fibrosis and stimulation of extracellular matrix deposition. Finally, M2c M ϕ polarized by dexamethasone, exhibited the M2a-like cytokine profile, i.e., VEGF was actively produced against the background of low TNF α and IL-6 synthesis. Moreover, all three M ϕ subpopulations did actively secrete MMP-9 and TIMP-1, without significant difference in production of these factors. However, M2c M ϕ differed by a significantly higher MMP-9/TIMP-1 ratio index compared to M1 and M2a M ϕ , and it is crucial at the rearrangement stage of the fibrotic process. Thus, the production of MMP-9 and TIMP-1, together with other pleiotropic cytokines and growth factors by various M ϕ subtypes may reflect their role in regulation of fibrotic process at various stages.

Keywords: macrophages, polarization, cytokines, matrix metalloproteinases, inhibitors of matrix metalloproteinases, fibrosis

Введение

Макрофаги (M ϕ) представляют гетерогенную популяцию клеток врожденного иммунитета, которые играют ключевую роль в поддержании гомеостаза тканей. В соответствии с потребностями и под влиянием факторов окружающей среды M ϕ дифференцируются в различные функциональные фенотипы, наиболее изученными представителями которых являются M1- и M2-макрофаги. Отличительной чертой M1-макрофагов является наличие провоспалительной активности, в то время как M2-клетки проявляют противовоспалительные свойства. M2 M ϕ играют важную роль в разрешении воспаления и стимуляции репаративных процессов и могут индуцироваться под действием различных факторов — IL-4/IL-13, иммуносупрессивных цитокинов (IL-10, TGF- β), иммунных комплексов, а также ряда гормонов и витаминов (дексаметазон и витамин D3). Важно, что в действительности спектр фенотипов M ϕ чрезвычайно широк, и внутри группы M2-макрофагов выделяют как минимум M2a, M2b, M2c и M2d подтипы [8, 24]. Характерными поверхностными маркерами для M1 являются CD68, CD86, CD80, CD14, MHCII, IL-1R. В свою очередь,

для M2a такими маркерами являются маннозный рецептор (CD206), CD200R, DecoyR (CD209), CD163, IL-1RII, MHCII. M2b-макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии CD86 и MHCII. Для M2c-клеток наиболее часто указываются CD163, CD206 и CD150, а также иногда SRA-1 и NR1C2 (PPAR- δ). Для M2d-макрофагов характерным маркером является рецептор к фактору роста эндотелия сосудов VEGF-A [9, 12, 24]. Способность M ϕ воспринимать сигналы микроокружения и реагировать на них изменением своего фенотипа обуславливает ключевую роль M ϕ в регуляции множества процессов в организме, включая репарацию и фиброз, и определяет M ϕ как «главные регуляторы воспаления и фиброза» [32].

Непосредственно после повреждения ткани DAMPs (damage-associated molecular patterns), PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и цитокины нейтрофилов активируют макрофаги (резидентные и рекрутированные моноциты) к продукции хемокинов, матриксных металлопротеиназ (MMPs) и цитокинов (IL-1 β , TNF α и др.), которые координируют развитие воспалительного ответа. Со временем, при нормальном развитии процесса, «воспалительный» фенотип M ϕ меняется на «репаративный», характеризую-

шийся секрецией различных ростовых факторов (VEGF, TGF- β , IGF-1), стимулирующих ангиогенез, а также пролиферацию фибробластов и резидентных прогениторных клеток. Параллельно с изменением фенотипа Мф происходит переключение исходно провоспалительной активности фибробластов на синтез новых компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), необходимых для восстановления нормальной структуры ткани [16]. Активность Мф в каждый конкретный момент тесно координируется с новыми функциями фибробластов и других клеток, участвующих в восстановлении и дифференцировке тканей.

В условиях острого и хронического воспаления нормальная репарация ткани может быть нарушена, что приводит либо к недостаточному восстановлению (длительно незаживающие раны), либо к избыточному накоплению белков внеклеточного матрикса (ВКМ), структурному и функциональному нарушению органа или ткани и развитию фиброза. Известно, что Мф принимают активное участие в регуляции пролиферации и дифференцировки фибробластов, образовании и деградации ВКМ, тем самым способствуя или препятствуя фибротическому процессу [1, 25]. При этом действие Мф может быть прямым или опосредованным растворимыми факторами [6], среди которых наибольший интерес представляют факторы роста и плейотропные цитокины (IL-10, TNF α , IL-4, IL-6, IFN γ и др.), регулирующие активность фибробластов и миофибробластов, а также синтез и продукцию коллагена и других белков ВКМ. Однако данные о способности различных субпопуляций Мф человека, и в особенности субпопуляций М2 Мф, секретировать факторы с про/антифибротической активностью, крайне немногочисленны и зачастую противоречивы. Согласно данным, полученным у экспериментальных животных, М1 Мф могут ингибировать фиброгенез и приводить к развитию вялотекущих раневых процессов [17, 27]. С другой стороны, М2а Мф обладают профибротическими свойствами и способствуют развитию фиброза [5]. Роль М2с Мф в развитии фиброза не выяснена; предполагается, что М2с регулируют реорганизацию ВКМ и ограничение фибротического процесса на завершающих стадиях формирования фиброза. Однако Мф человека в значительной мере отличаются от Мф мыши, в частности по спектру продуцируемых металлопротеиназ [13]. Исходя из вышесказанного, **целью данного исследования** явилась сравнительная характеристика М1-, М2а- и М2с-макрофагов человека по продукции ими про- и антифибротических факторов.

Материалы и методы

Генерация М1, М2а и М2с подтипов макрофагов

В исследование были включены 14 условно здоровых доноров в возрасте 23-49 лет. Монону-

клеарные клетки (МНК) получали центрифугированием гепаринизированной крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) 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-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодородной коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. Поляризирующие стимулы (10 мкг/мл LPS для М1 (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, США) 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США) для М2а, 50 нг/мл дексаметазона (Dex) (KRKA, Словения) для М2с) добавляли на 5 день. По окончании срока культивирования макрофаги (Мф) получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). От каждого донора крови получали как М1, так и М2а и М2с Мф.

Определение цитокинов в культурах Мф

Уровень продукции TNF α , IL-6, IL-2, IL-10 и IL-8 определяли в 7-суточных супернатантах культур GM-CSF-дифференцированных Мф методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Rad, Hercules, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США; чувствительность 2 пг/мл), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Уровень продукция VEGF, MMP-9 и TIMP-1 в супернатантах 7-дневных культур Мф определяли с помощью ELISA kit (все наборы R&D System, США) в соответствии с инструкцией производителя в автоматическом считывателе микропланшетов на длине волны 450 нм. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества Мф и выражали в пг/мл/10⁵ клеток-продуктентов.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft. Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность данных оценивалась с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок, критерия Манна-Уитни и критерия знаков; различия считались значимыми при $p < 0,05$. Критерии достоверности * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Результаты

Макрофаги являются основным источником нескольких типов MMPs (MMP-1, MMP-7,

MMP-8, MMP-9 и MMP-12), а также их эндогенных супрессоров, тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMPs). Данные, характеризующие концентрацию MMP-9 и TIMP-1 в 7-дневных супернатантах культур M1 (LPS), M2a (IL-4) и M2c (Dex) представлены на рисунке 1. Видно, что все три исследованные популяции Мф активно продуцировали MMP-9 и TIMP-1. В то же время уровень MMP-9 в культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофагов превышал таковой в культуре M1 (LPS) (4,3 нг/мл, IQR 3,5-6,1). При этом наибольшее содержание MMP-9 выявлялось в культурах M2a (5,5 нг/мл, IQR 3,9-7,4), а наименьшее – в культурах M1 (LPS) Мф (4,3 нг/мл, IQR 3,5-6,1) ($p > 0,05$). Уровень TIMP-1 был максимальным в культурах M2a (0,67 нг/мл, IQR 0,28-0,68) и сопоставимым в культурах M1 Мф (0,62 нг/мл, IQR 0,47-1,05), в то время как M2c Мф демонстрировали наименьший уровень продукции (0,49 нг/мл, IQR 0,09-0,74) ($p > 0,05$).

Так как в регуляции процессов синтеза/деградации соединительной ткани решающее значение играет баланс MMPs и TIMPs, мы проанализировали значения соотношений MMP-9/TIMP-1 для различных типов макрофагов. Оказалось, что наибольшие значения MMP-9/TIMP-1 были характерны для M2c Мф (9,7; IQR 4,7-43,1), в то время как M1 и M2a Мф характеризовались значимо меньшими значениями: 7,42 (IQR 3,6-7,2, $p = 0,045$) и 9,0 (IQR 4,2-16,8, $p = 0,045$) соответственно.

Поскольку синтез MMPs и TIMPs контролируется различными стимулами, в том числе растворимыми медиаторами, на следующем этапе мы исследовали концентрацию некоторых цитокинов и ростовых факторов в 7-дневных супернатантах культур M1 (LPS), M2a (IL-4) и M2c

(Dex), стандартизованных по количеству (рис. 2). Видно, что M1 (LPS) Мф отличались высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов – TNF α (Me 48470 пг/мл), IL-6 (588 пг/мл) и IL-2 (358 пг/мл). Кроме того, M1 (LPS) макрофаги активно продуцировали противовоспалительный цитокин IL-10 (103 пг/мл), а также VEGF (325 пг/мл) и хемокин IL-8 (7904 пг/мл).

По сравнению с M1 (LPS), M2 Мф характеризовались выраженным снижением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее ярко это проявлялось в отношении TNF α , содержание которого в супернатантах M2a (IL-4) и M2c (Dex) было снижено практически в 70 раз и составляло, соответственно, 733 пг/мл (*vs* 48470; $p = 0,08$) и 701 пг/мл (*vs* 48470; $p = 0,049$). Уровень продукции IL-6 был снижен более чем в 2 раза как в культурах M2a (IL-4) (249 *vs* 588 пг/мл; $p = 0,03$), так и в супернатантах M2c (Dex) макрофагов (253 *vs* 588 пг/мл; $p = 0,025$). В культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) Мф регистрировалось также практически 5-кратное снижение продукции IL-2. Так, M2a (IL-4) Мф продуцировали IL-2 на уровне 75 пг/мл (*vs* 358; $p = 0,03$), а M2c (Dex) – 81 пг/мл (*vs* 358; $p = 0,049$). Наряду со сниженным уровнем TNF α , IL-6 и IL-2, M2 макрофаги демонстрировали низкий уровень продукции IL-10. Действительно, по сравнению с M1 (LPS), содержание IL-10 в культурах M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофагов составляло 6,1 и 4,8 пг/мл соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях).

В противоположность снижению продукции про- и противовоспалительных цитокинов, M2a (IL-4) и M2c (Dex) макрофаги активно продуцировали VEGF и IL-8. Из рисунка 2 видно, что уровень VEGF в культурах M2a (IL-4) макрофагов более чем в 6 раз превышал таковой в супернатан-

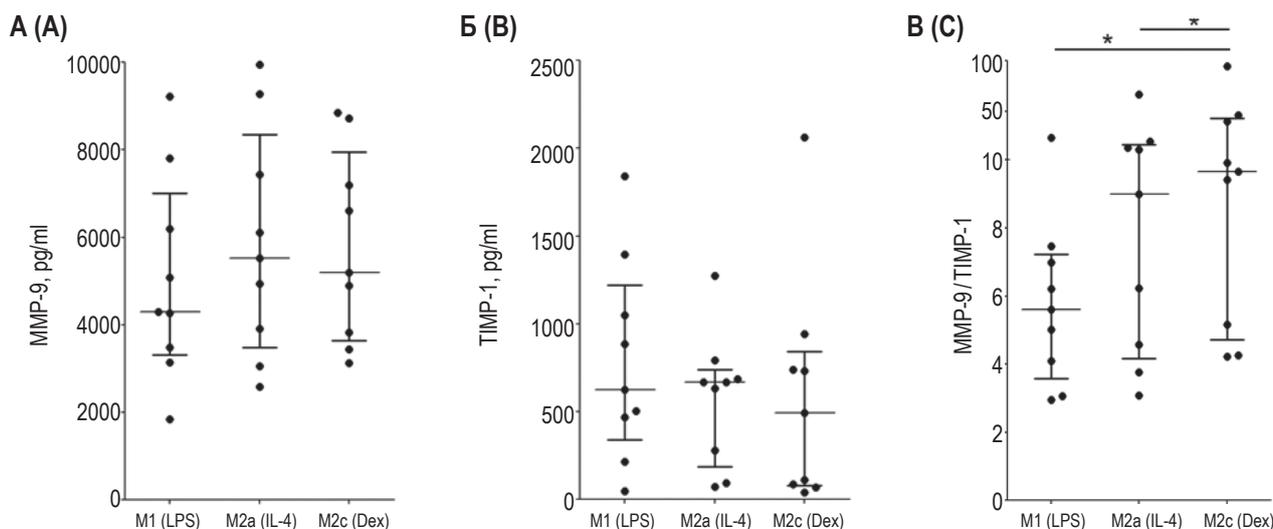


Рисунок 1. Продукция MMP-9 и TIMP-1 различными субпопуляциями макрофагов

Примечание. Данные представлены в виде индивидуальных значений, медианы и интерквартильного диапазона, * – $p < 0,05$.

Figure 1. MMP-9 and TIMP-1 production by various macrophage subpopulations

Note. Data are presented as individual values, median and interquartile range, * – $p < 0.05$.

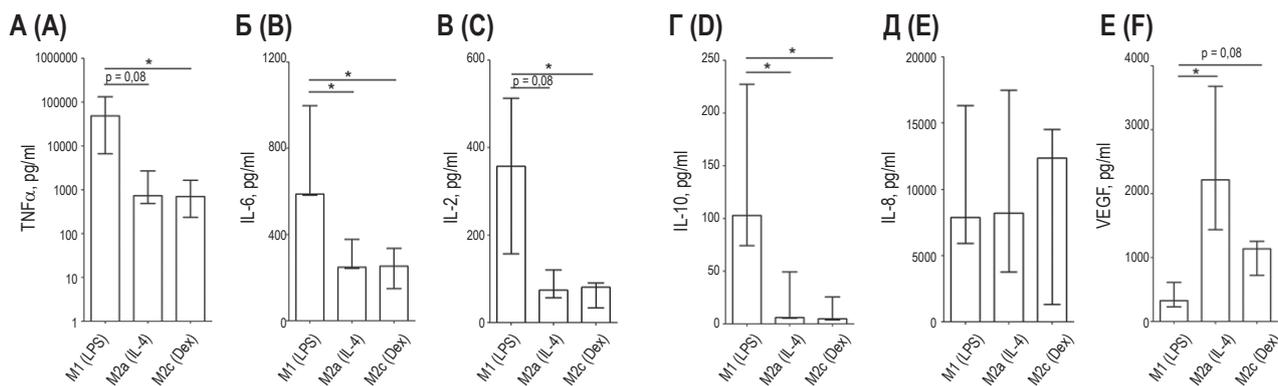


Рисунок 2. Содержание цитокинов в супернатантах 7-дневных культур M1 и M2 макрофагов

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, * – $p < 0,05$.

Figure 2. The content of cytokines in the supernatants of 7-day-old cultures of M1 and M2 macrophages

Note. Data are presented as the median and interquartile range, * – $p < 0.05$.

тах M1 (LPS) Мф (2215 vs 325 пг/мл; $p = 0,009$) и практически в 2 раза – в супернатантах M2c (Dex) (2215 vs 1137; $p = 0,07$). Уровень продукции IL-8 был наиболее высоким в культурах M2c (Dex) Мф (12330 пг/мл), что более чем в 1,5 раза превышало содержание IL-8 в культурах M1 (LPS) Мф, однако эти различия были недостоверны ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ секреторной активности двух субпопуляций M2-макрофагов, M2a (IL-4) и M2c (Dex), показал, что спектр и уровень продукции большинства исследуемых цитокинов в супернатантах указанных Мф был схожим. Действительно, M2a (IL-4) и M2c (Dex) Мф характеризовались низкой продукцией про- и противовоспалительных цитокинов и высоким уровнем продукции ростовых факторов и хемокинов. Примечательно при этом, что M2a (IL-4) клетки демонстрировали максимальный уровень VEGF, в то время как в культурах M2c (Dex) содержание VEGF было также повышенным по сравнению с M1 (LPS) Мф, однако не достигало уровня M2a (IL-4) ($p < 0,05$).

Обсуждение

Благодаря пластичности и широкому спектру продуцируемых растворимых факторов, макрофаги регулируют течение фибротического процесса, последовательно изменяя свой функциональный фенотип в зависимости от стадии. Так, предполагают, что M1 Мф принимают участие в запуске фибротического процесса, хотя на более поздних стадиях могут препятствовать нормальному ранозаживлению. Так, например, было показано, что в краях хронически незаживающих ран преобладают M1-макрофаги, играющие основную роль в патогенезе хронизации раны [12]. Переключение M1-фенотипа на M2a ассоциируется со снижением воспалительной активности и переходом в стадию пролиферации, характеризующуюся активацией миофибробластов и активным отложением внеклеточного матрикса

(ВКМ). На стадии разрешения фиброза ключевая роль отводится M2c Мф – считается, что они обеспечивают реорганизацию соединительной ткани и ограничение фибротического процесса [9].

Макрофаги продуцируют несколько типов матричных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12) и их тканевых ингибиторов (TIMP). MMPs отвечают за разрезание компонентов внеклеточного матрикса (преимущественно коллагена), а TIMPs, связываясь с их активными сайтами, ингибируют действие MMPs. Уровень синтеза MMPs и TIMPs может регулироваться различными стимулами, среди которых ключевую роль играют ростовые факторы и цитокины. Баланс MMPs и TIMPs в организме имеет решающее значение для нормального течения процессов синтеза и деградации соединительной ткани, а нарушение этого баланса может приводить к развитию фиброза – избыточной продукции и отложению ВКМ.

Среди различных металлопротеиназ макрофагальной природы MMP-9 является наиболее важной профиброгенной металлопротеиназой, ингибирование или делеция которой снижает фиброз в моделях дилатационной кардиомиопатии и инфаркта миокарда [18, 22]. В настоящем исследовании показано, что наибольший уровень продукции MMP-9 и TIMP-1 выявляется в культурах GM-CSF-дифференцированных M2a (IL-4) Мф. При этом активность TIMP-1 представляет интерес не только с точки зрения MMP-ассоциированных эффектов на функционирование ВКМ. Известно, что семейство TIMP, включая TIMP-1, участвует в регуляции роста различных типов клеток, в частности стимулируя пролиферацию фибробластов [21]. Исходя из этого, высокий уровень продукции TIMP-1, с одной стороны, способствует снижению активности MMPs, а с другой – усиливает рост фибробластов, что является основным фактором развития фиброза. В совокупности эти данные

свидетельствуют о профиброгенном потенциале M2a (IL-4) Мф. В отличие от M2a, M2c (Dex) Мф характеризуются наименьшим уровнем продукции TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1. Считается, что роль M2c Мф значительно возрастает в фазе ремоделирования [9], поэтому преобладание MMP-9 над TIMP-1 в культурах M2c (Dex) Мф может указывать на способность этого типа Мф ограничивать синтез соединительной ткани. Кроме того, низкий уровень TIMP-1 прямо коррелирует со сниженной пролиферацией фибробластов, что также способствует ограничению фиброза [20].

Говоря о роли MMPs в фиброгенезе, важно понимать, что разные типы клеток-продуцентов MMPs (эпителиальные клетки, фибробласты, макрофаги, фиброциты или лейкоциты периферической крови) оказывают различное влияние на фибротический процесс, так что повышенная экспрессия MMP в одном типе клеток может быть «профиброгенной», тогда как в другом — отражать «антифиброгенную» активность. Подобно этому, MMPs могут иметь одну функцию на ранних стадиях процессов заживления ран и совершенно противоположную — в поддержании или распространении фиброза. Следовательно, практически невозможно охарактеризовать конкретную MMP исключительно как «про-» или «анти-» профиброгенную [3].

Синтез MMPs и TIMPs контролируется различными сигналами микроокружения, в том числе ростовыми факторами и цитокинами. Известно, что в регуляции синтеза ВКМ ключевую роль играет TGF- β 1 [23]. В то же время различные факторы воспалительного микроокружения, включая цитокины, также оказывают влияние на фиброгенез, действуя либо непосредственно на продукцию белков ВКМ, либо через TGF- β 1-индуцированные эффекты. При этом эффекты цитокинов могут значительно варьировать в зависимости от стадии фибротического процесса. В исследованиях, выполненных преимущественно на экспериментальных животных, показано, что TNF α и IL-6 имеют ключевое значение на начальных этапах. Так, было продемонстрировано, что TNF α запускает формирование фиброза печени и способствует его прогрессии [34], а использование анти-TNF α моноклональных антител предотвращает развитие фиброза [31]. Аналогичной способностью запускать фибротический процесс обладает и IL-6 [7]. Помимо этого, в исследовании Liu X. было показано, что провоспалительные цитокины — IL-1 β , TNF α и IFN γ — усиливают TGF- β 1-индуцированную продукцию ВКМ через активацию рецептора TGF- β типа I [19]. Полученные нами результаты о выраженной продукции TNF α и IL-6 M1 (LPS) макрофагами согласуются с вышеупомянутыми работами и свидетельствуют о способности M1 (LPS) Мф с провоспалительным фенотипом иници-

ровать фиброз. Не противоречит такому взгляду на M1 (LPS) Мф и высокий уровень продукции IL-2 в культурах этих клеток. Считается, что IL-2 может вносить непосредственный вклад в активность фибробластов, поскольку фибробласты экспрессируют функционально активные IL-2R, в частности субъединицы β и γ [4]. В качестве одного из механизмов IL-2-индуцированного роста фибробластов рассматривается аутофагия [15].

На более поздних стадиях фиброза (пролиферативной стадии и стадии разрешения) TNF α и IL-6 могут оказывать ингибирующее влияние на развитие фиброза. Так, например, показано, что TNF α подавляет экспрессию гена α 1-цепи коллагена I [11]. Согласно данным Redente E.F. и соавт., введение TNF α мышам с развившимся легочным фиброзом уменьшает фиброзную нагрузку, улучшает функцию и архитектуру легких [26]. С учетом определяющей роли стадии фиброза как для реализации эффектов цитокинов, так и в плане доминирующего фенотипа Мф, относительно невысокое содержание TNF α и IL-6 в культурах M2a (IL-4) может указывать на профибротические свойства M2a, а в культурах M2c (Dex) Мф — отражать антифибротические свойства M2c макрофагов. Следует подчеркнуть, что двойственный характер эффектов описан и для других цитокинов — IFN γ , IL-4 и др. [14, 30].

Наряду с ожидаемо высокой секрецией провоспалительных цитокинов, M1 (LPS) макрофаги в нашем исследовании продуцировали также значимо более высокие количества (по сравнению с M2 Мф) IL-10, который, как полагают, обладает антифиброгенным эффектом [28]. Данная особенность M1-макрофагов может быть связана с природой используемого поляризующего стимула, так как известно, что LPS индуцирует продукцию IL-10 в Мф [2, 29].

Ростовые факторы также принимают активное участие в процессе фиброгенеза, в основном оказывая профиброгенное (TGF- β , PDGF, FGF, VEGF, IGF) и в некоторых случаях — антифиброгенное действие (HGF) [28]. При этом если TGF- β является ключевым профиброгенным фактором, то роль некоторых других ростовых факторов, в частности VEGF, в развитии фибротического процесса не так однозначна. Показано, что VEGF, с одной стороны, может оказывать стимулирующий эффект на пролиферацию и активацию фибробластов, а с другой — играет важную роль в разрешении фиброза [33]. В модели блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей VEGF описывается как профиброгенный медиатор [10]. Выявленный нами высокий уровень продукции VEGF в культурах M2a Мф может указывать на способность данного типа Мф оказывать профиброгенный эффект на пролиферативной стадии развития фиброза. С другой стороны, VEGF, продуцируемый M2c Мф, роль

которых возрастает на стадии ремоделирования, по-видимому, необходим для нормального разрешения фибротического процесса.

В целом исследование секреторной активности макрофагов показало, что M1 (LPS) Мф могут принимать участие на ранних этапах формирования фиброза (этапах инициации), продуцируя такие провоспалительные цитокины, как TNF α и IL-6. В свою очередь, M2a (IL-4) Мф продуцируют факторы, которые на пролиферативной стадии фиброза обеспечивают активацию фибробластов, их пролиферацию и синтез коллагена, что говорит об их важной роли в разгарае фибротического процесса. И наконец, M2c Мф харак-

теризуются высоким уровнем продукции VEGF, а также индексом соотношения MMP-9/TIMP-1, которые играют важную роль на стадии разрешения. Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что секреторная активность различных подтипов макрофагов является отражением их роли в регуляции фиброза. В то же время, поскольку в основе развития фиброза лежит пролиферация фибробластов, целью наших дальнейших исследований является изучение влияния различных типов макрофагов на рост и функциональную активность фибробластов, что позволит наиболее полно охарактеризовать участие макрофагов в развитии фиброза.

Список литературы / References

1. Adhyatmika A., Putri K.S.S., Beljaars L., Melgert B.N. The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med.*, 2015, Vol. 2, pp. 1-11.
2. Chanteux H., Guisset A.C., Pilette C., Sibille Y. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir. Res.*, 2007, Vol. 8, pp. 1-10.
3. Craig V.J., Zhang L., Hagood J.S., Owen C.A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 585-600.
4. Doersch K.M., DelloStritto D.J., Newell-Rogers M.K. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2017, Vol. 242, no. 4, pp. 384-396.
5. Duan J., Liu X., Wang H., Guo S.W. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, Vol. 37, no. 3, pp. 254-268.
6. Feng Y., Sun Z.L., Liu S.Y., Wu J.J., Zhao B.H., Lv G.Z., Du Y., Yu S., Yang M.L., Yuan F.L., Zhou X.J. Direct and indirect roles of macrophages in hypertrophic scar formation. *Front. Physiol.*, 2019, no. 10, 1101. doi: 10.3389/fphys.2019.01101.
7. Fielding C.A., Jones G.W., McLoughlin R.M., McLeod L., Hammond V.J., Uceda J., Williams A.S., Lambie M., Foster T.L., Liao C., Rice C.M., Greenhill C.J., Colmont C.S., Hams E., Coles B., Kift-Morgan A., Newton Z., Craig K.J., Williams J.D., Williams G.T., Davies S.J., Humphreys I.R., O'Donnell V.B., Taylor P.R., Jenkins B.J., Topley N., Jones S.A. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 1, pp. 40-50.
8. Fraternali A., Brundu S., Magnani M. Polarization and repolarization of macrophages. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2015, Vol. 6, no. 2, pp. 1-10.
9. Gensel J.C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 2015, Vol. 1619, pp. 1-11.
10. Hamada N., Kuwano K., Yamada M., Hagimoto N., Hiasa K., Egashira K., Nakashima N., Maeyama T., Yoshimi M., Nakanishi Y. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 2, pp. 1224-1231.
11. Hernandez-Munoz I., de la Torre P., Sanchez-Alcazar J.A., Garcia I., Santiago E., Munoz-Yague M.T., Solis-Herruzo, J.A. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen alpha 1 (I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G protein. *Gastroenterology*, 1997, Vol. 113, no. 2, pp. 625-640.
12. Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E., Murray R.Z. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 7, 1545. doi: 10.3390/ijms18071545.
13. Huang W.C., Sala-Newby G.B., Susana A., Johnson J.L., Newby A.C. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 8, e42507. doi: 10.1371/journal.pone.0042507.
14. Huaux F., Liu T., McGarry B., Ullenbruch M., Phan S.H. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 4, pp. 2083-2092.
15. Kang R., Tang D., Lotze M.T., Zeh III H.J. Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth. *Exp. Cell Res.*, 2013, Vol. 319, no. 4, pp. 556-565.
16. Karin M., Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 2016, Vol. 529, no. 7586, pp. 307-315.
17. Li B., Liu Y.M., Yan Y., Yang N., Gao J., Jiang T., Shang X.Q., Tian F.M., Ding J.B., Ma X.M. Effect of different types of macrophages on hepatic fibrosis in *Echinococcus Granulosus* mice. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 117, 109178. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109178.
18. Lim D.H., Cho J.Y., Miller M., McElwain K., McElwain S., Broide D.H. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2006, Vol. 291, no. 2, pp. L265-L271.
19. Liu X. Inflammatory cytokines augments TGF- β 1 - induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating T β R-I. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, 2008, no. 65, pp. 935-944.
20. Lovelock J.D., Baker A.H., Gao F., Dong J.F., Bergeron A.L., McPheat W., Sivasubramanian N., Mann D.L. Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, Vol. 288, no. 2, pp. H461-H468.

21. Lu Y., Liu S., Zhang S., Cai G., Jiang H., Su H., Li X., Hong Q., Zhang X., Chen X. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-Akt and cell cycle progression. *Mol. Cells*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 225-230.
22. Matsumoto Y., Park I.K., Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of c protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 7, pp. 4773-4781.
23. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
24. Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Characteristics and role of macrophages in pathogenesis of acute and chronic lung diseases. *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 657-672. doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-657-672
25. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.*, 2018, Vol. 68-69, pp. 81-93.
26. Redente E.F., Keith R.C., Janssen W., Henson P.M., Ortiz L.A., Downey G.P., Bratton D.L., Riches D.W. Tumor necrosis factor- α accelerates the resolution of established pulmonary fibrosis in mice by targeting profibrotic lung macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 50, no. 4, pp. 825-837.
27. Sindrilaru A., Peters T., Wieschalka S., Baican C., Baican A., Peter H., Hainzl A., Schatz S., Qi Y., Schlecht A., Weiss J.M., Wlaschek M., Sunderkötter C., Scharfetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 3, pp. 985-997.
28. Sziksz E., Pap D., Lippai R., Béres N.J., Fekete A., Szabó A.J., Vannay Á. Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm.*, 2015, 764641. doi: 10.1155/2015/764641.
29. van der Plas M.J.A., van Dissel J.T., Nibbering P.H. Maggot secretions skew monocyte-macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic type. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 11, e8071. doi: 10.1371/journal.pone.0008071.
30. Weng H.-L., Wang B.-E., Jia J.-D., Wu W.-F., Xian J.-Z., Mertens P.R., Cai W.-M., Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, Vol. 3, no. 8, pp. 819-828.
31. Westermann D., Linthout S., Dhayat S., Dhayat N., Schmidt A., Noutsias M., Song X.-Y., Spillmann F., Riad A., Schultheiss H.-P., Tschöpe C. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.*, 2007, Vol. 102, no. 6, pp. 500-507.
32. Wynn T., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, 2010, Vol. 30, no. 3, pp. 245-257.
33. Yang L., Kwon J., Popov Y., Gajdos G.B., Ordog T., Brekken R.A., Mukhopadhyay D., Schuppan D., Bi Y., Simonetto D., Shah V.H. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*, 2014, Vol. 146, no. 5, pp. 1339-1350.e1.
34. Yang Y.M., Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr. Pathobiol. Rep.*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 253-261.

Авторы:

Максимова А.А. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сахно Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Maksimova A.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sakhno L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 18.02.2020

Отправлена на доработку 18.03.2020

Принята к печати 17.04.2020

Received 18.02.2020

Revision received 18.03.2020

Accepted 17.04.2020