

# РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА У М1 И М2 ФЕНОТИПОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СЫВОРОТКИ

Круглов С.В.<sup>1,2</sup>, Лямина С.В.<sup>1</sup>, Веденикин Т.Ю.<sup>1</sup>,  
Бородовицына О.А.<sup>1</sup>, Суворова И.А.<sup>1</sup>,  
Шимшелашвили Ш.Л.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва

<sup>2</sup> ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

**Резюме.** Макрофаги играют одну из центральных ролей в развитии воспаления, приобретая в зависимости от микроокружения или провоспалительный М1, или противовоспалительный М2 фенотип. Некоторые эндогенные факторы репрограммирования макрофагов, например, TGF- $\beta$ , программирующий макрофаги в сторону М2 фенотипа, находятся в сыворотке крови. В данной работе подтверждена гипотеза о том, что с помощью снижения и увеличения концентрации сыворотки в окружающей макрофагов среде можно альтернативно репрограммировать фенотип макрофагов в сторону М1 или М2, при этом не было выявлено принципиальных качественных отличий в способности к репрограммированию макрофагов мышей линии C57BL/6 и BALB/c. В целом, наши данные позволяют дополнить существующие знания о роли факторов окружающей среды в регуляции активности макрофагов.

*Ключевые слова:* репрограммирование, фенотипы макрофагов, оксид азота.

*Kruglov S.V., Lyamina S.V., Vedenikin T.Yu., Borodovizyna O.A., Suvorova I.A., Shimshelashvili Sh.L., Malyshev I.Yu.*

***IN VITRO* REPROGRAMMING OF NITRIC OXIDE-SYNTHETIC MECHANISMS FOR M1 AND M2 PHENOTYPES OF MURINE PERITONEAL MACROPHAGES: DEPENDENCE ON DIFFERENT SERUM CONCENTRATIONS**

**Abstract.** Macrophages are among key players of inflammatory events, acquiring either pro-inflammatory M1, or anti-inflammatory M2 phenotype, dependent on their microenvironment. Some endogenous macrophage-reprogramming factors (MRFs), e.g., TGF- $\beta$  (an M2-inducing agent), are found in blood serum. This work confirms a hypothesis on *in vitro* M1-to-M2 phenotype reprogramming of cultured macrophages, by means of decrease or increase in serum concentration. Noteworthy, the macrophages from C57BL/6 и BALB/c mice

strains did not differ with their reprogramming capacity. In general, our results allow of extending present knowledge about a role of environmental factors in regulation of macrophage activities. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 127-132)

**Адрес для переписки:**

Малышев Игорь Юрьевич  
105275, Москва, ул. Бориса Жигуленкова, 23/1.  
Тел.: (985) 766-24-40.  
E-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

*Keywords:* reprogramming, macrophages, phenotype, nitric oxide.

## Введение

Основным звеном патогенеза многих заболеваний является неадекватное течение воспалительной реакции [1; 2]. В связи с этим, изучение возможности ее коррекции является одной из фундаментальных проблем медицины.

Центральную роль в развитии воспаления играют макрофаги. При этом при взаимодействии макрофагов с внутриклеточными микробами – вирусами и бактериями и/или с  $IFN\gamma$ , формируется классический M1 фенотип макрофагов [11]. M1 макрофаги продуцируют много провоспалительных цитокинов IL-12, IL-18, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , активных форм кислорода (АФК) и оксида азота (NO) [5; 10], обладают выраженными фагоцитарными и бактерицидными свойствами и интегрированы в Th1 ответ, который убивает бактерии, вирусы и опухолевые клетки [9]. Поверхностно-клеточными маркерами M1 являются MAPK0-рецептор, CD80, CD86, TLR-2, TLR-4, Fc $\gamma$ RIII (CD16), Fc $\gamma$ RII (CD32), CD62, IL-1r1, CD127 [9; 10]; функциональным маркером – усиленная продукция NO за счет активации индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [8, 14], а морфологическим – округлая форма в культуре клеток [4].

Если макрофаги взаимодействуют с экстраклеточными паразитами – грибами или гельминтами и/или с IL-4 и IL-13 они приобретают альтернативный M2 фенотип [11]. M2 выделяют много противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-13, TGF- $\beta$  [9; 11; 12], значительно меньше провоспалительных цитокинов, АФК и NO, по сравнению с M1. M2 макрофаги интегрированы в Th2 ответ, который убивает экстраклеточных паразитов. M2 регулируют воспаление, участвуют в ремоделировании и репарации поврежденных тканей, и способствуют ангиогенезу и опухолевому росту [9; 10]. Поверхностно-клеточными маркерами M2 являются маннозный рецептор (MRC1, CD206), CD163, Fc $\epsilon$ RII (CD23), CD209, FIZZ1, ST2, рецепторы SR-A и M60, CD184, TRAIL, IL-1r1 $\alpha$  [10], а морфологическим маркером – фибробластоподобная форма в культуре клеток.

При заболеваниях фенотип макрофагов может меняться. В одних случаях репрограммирование фенотипа является адекватным «терапевтическим» и обеспечивает выздоровление, в других – неадекватным «патогенетическим» и может способствовать прогрессированию заболевания. В связи с этим возник колоссальный интерес к способам коррекции фенотипа и факторам репрограммирования макрофагов (ФРМ). Так, стало известно, что некоторые эндогенные ФРМ находятся в сыворотке крови, например, TGF- $\beta$ , который программирует макрофаги в сторону M2 фенотипа [4]. Исходя из этого, мы предполо-

жили, что с помощью снижения или увеличения концентрации сыворотки в окружающей макрофагов среде, можно альтернативно репрограммировать структурно-функциональные свойства макрофагов в направлении M1 или M2 фенотипа. Цель данной работы состояла в проверке этой гипотезы на перитонеальных макрофагах мышей.

## Материалы и методы

Эксперименты проводились на культуре перитонеальных макрофагов, выделенных от мышей линии C57BL/6 и BALB/c, которые имеют генетически детерминированный M1 и M2 фенотип макрофагов, соответственно [4]. Мышей наркотизировали хлоралгидратом (32,5 мг на 100 г массы тела, в/б). Перитонеальные макрофаги были выделены из перитонеального смыва мышей. Полученный смыв с макрофагами центрифугировали при 1000 оборотов/мин, 4 мин., при комнатной температуре. Супернатант отделяли, а осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640 без сыворотки, взвесь клеток доводили до нужной концентрации, делили на три пула (пул 0, пул 1 и пул 2) и размещали в плоскодонные лунки 48-ми луночных культуральных планшетов из расчета 0,5 млн. клеток на лунку в 0,5 мл среды. Через час среду заменяли новой средой RPMI 1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой с 100 У/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и еще через час начинали процедуру репрограммирования фенотипа макрофагов.

Пул 0 культивировали при нормальной концентрации сыворотки – 10%, пул 1 – в отсутствие сыворотки с целью репрограммирования в сторону M1 фенотипа, а пул 2 – при повышенной (20%) концентрации сыворотки с целью репрограммирования в сторону M2 фенотип. Все три пула культивировали или в течение 12 часов, для тестирования функциональной активности, или в течение 24 часов, для оценки морфологических отличий между пулами. После выделения жизнеспособность макрофагов, при оценке с трипановым синим, была не ниже 95-97%, а через 12-24 часа культивирования снижалась не более чем на 1-2%.

В наших экспериментах, для активации макрофагов и оценки функциональной активности, после 12-часовой процедуры репрограммирования, мы добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл на 24 часа. После этого оценивали функциональный маркер M1/M2 фенотипа – продукцию NO макрофагами спектрофотометрически, по содержанию нитритов в культуральной среде с помощью реакции Грисса [14] и содержание iNOS методом Western blot анализ [16]. Для морфологической характеристики всего пула макрофагов макрофаги культиви-

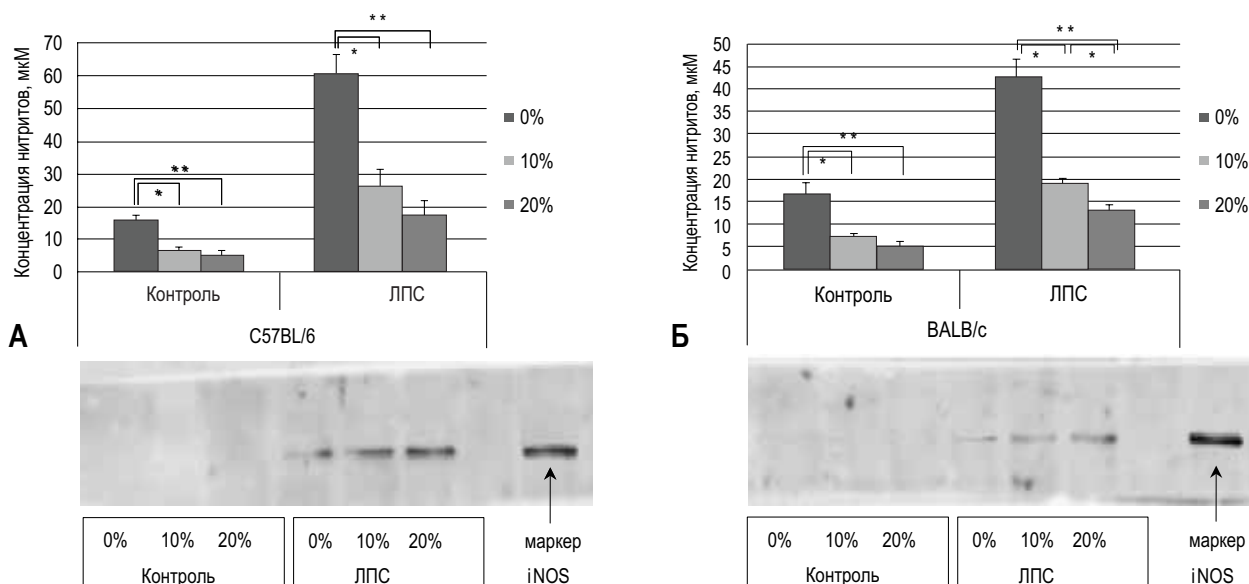
ровали 24 часа, после чего оценивали структурный маркер M1/M2 фенотипа – форму клеток и рассчитывали морфологический индекс как соотношение количества макрофагов с фибробластоподобной формой (M2) к количеству макрофагов с округлой формой (M1) среди 100 клеток, подсчитанных в 5 квадратах поля зрения лунки.

## Результаты

Данные об изменении функциональной NO-генерирующей активности макрофагов после процедуры репрограммирования представлены на рисунке 1. Видно, что культивирование макрофагов в среде, содержащей 20% сыворотки, не приводило к изменению базальной (нестимулированной) продукции NO ни у макрофагов C57BL/6, ни у BALB/c (рис. 1, контроль), однако снижало способность макрофагов обеих линий к генерации NO в ответ на ЛПС (рис. 1, ЛПС). Эти изменения возможно отражают процесс репрограммирования макрофагов в сторону M2 фенотипа. Культивирование макрофагов в среде, содержащей 0% сыворотки, достоверно повысило базальную продукцию NO как макрофагов C57BL/6, так и BALB/c (рис. 1, контроль), а также привело к существенному увеличению способности макрофагов обеих линий к генерации NO в ответ на ЛПС (рис. 1, ЛПС). Эти изменения возможно отражают процесс репрограммирования макрофагов в сторону M1 фенотипа. Обращает на себя внимание, то, что существенное

увеличение базальной продукции NO (по содержанию нитритов) при снижении концентрации сыворотки до 0%, в обеих линиях макрофагов происходило без увеличения содержания iNOS. Вероятно, это можно объяснить тем, что удаление сыворотки приводит к удалению какого-то фактора, который блокировал активность iNOS, которая в небольших количествах могла содержаться в нестимулированных макрофагах.

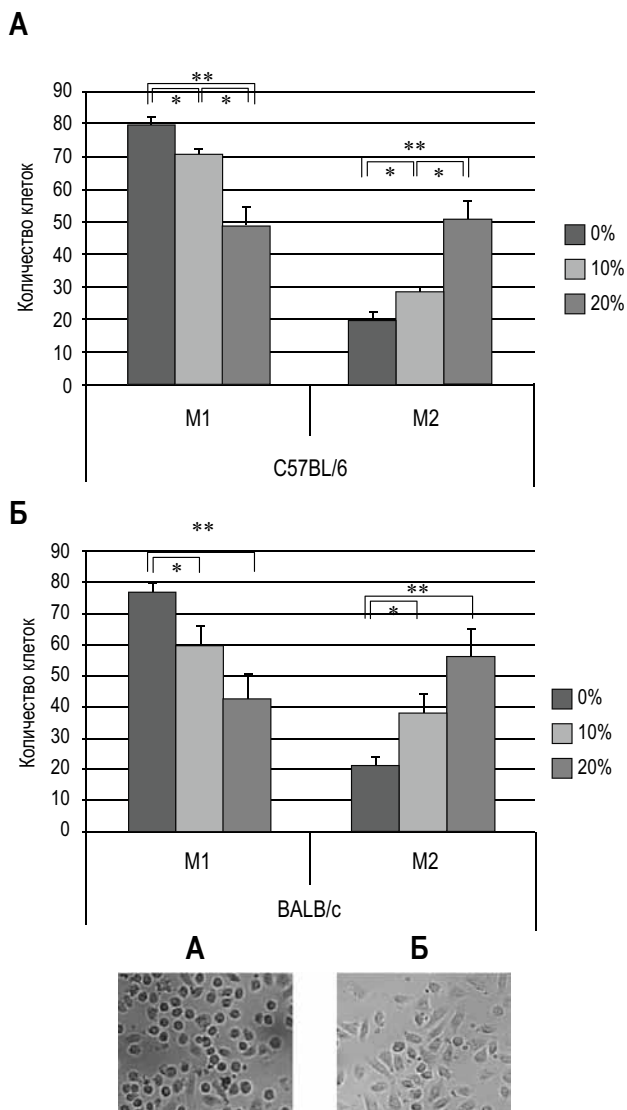
Вслед за изменениями функциональной активности клеток происходили морфологические изменения. Через 12 часов культивирования, когда разные пулы макрофагов уже стали отличаться по функциональному критерию, морфологических различий между пулами еще не наблюдалось. Морфологические различия стали проявляться лишь после 24 часов культивирования с разными концентрациями сыворотки. Эти данные представлены на рисунке 2. Видно, что для макрофагов мышей линии C57BL/6 увеличение сыворотки в культуральной среде с 0 до 20% приводило к достоверному увеличению клеток с фибробластоподобной формой с 20 до 51%. Поскольку такая форма клеток характерна для M2 фенотипа, наблюдаемые морфологические изменения согласуются с функциональными (продукция NO) и подтверждают предположение о репрограммировании макрофагов в сторону M2 фенотипа. Соответственно морфологический индекс (соотношение количества клеток с M2 фенотипом к количеству клеток с M1 фенотипом)



**Рисунок 1.** Влияние разных концентраций сыворотки [0, 10, 20%] на содержание нитритов в культуральной среде макрофагов и содержание iNOS в макрофагах мышей линии C57BL/6 (вставка А) и BALB/c (вставка Б) при стимуляции ЛПС

**Примечание.** В верхней части каждой вставки представлены гистограммы изменения содержания нитритов в культуральной среде. Достоверность отличий: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

В нижней части каждой вставки представлены оригинальные иммуноблоты. Интенсивность окрашивания и толщина черных полос отражает содержание белка iNOS в макрофагах.



**Рисунок 2. Влияние концентрации сыворотки [0, 10, 20%] в культуральной среде на количество макрофагов с круглой [M1] и расплющенной фибробластоподобной [M2] формой**

**Примечание.** Достоверность отличий: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

На вставке А – макрофаги мышей линии С57 [M1 линия] после культивирования с 0% ФБС через 24 часа. Видны макрофаги округлой формы в подавляющем большинстве.

На вставке Б – макрофаги мышей линии BALB [M2 линия] после культивирования с 20% ФБС через 24 часа. Видны макрофаги распластанной фибробластоподобной формы в подавляющем большинстве.

менялся с 0,25 до 1,04. Напротив, снижение содержания сыворотки в культуральной среде с 20 до 0% приводило к увеличению клеток округлой формы с 49 до 80%, что вместе с функциональным критерием фенотипа макрофагов позволяет предположить репрограммирование макрофагов в сторону M1 фенотипа. Соответственным образом морфологический индекс снижался с 1,04 до 0,25.

Аналогичные изменения происходили и с макрофагами, выделенными от мышей линии BALB/c (рис. 2). В нашей работе мы не обнаружили принципиальных качественных отличий в способности к репрограммированию механизмов генерации NO макрофагов линии C57BL/6 и BALB/c. Обращает на себя внимание лишь то, что во всех случаях продукция NO макрофагами C57BL/6 была выше, чем макрофагами BALB/c. Это объясняется тем, что макрофаги C57BL/6 генетически более склонны к проявлению M1 фенотипа, BALB/c – M2 фенотипа [4].

## Обсуждение

Представленные здесь данные подтвердили нашу гипотезу о том что при отсутствии в среде сыворотки можно репрограммировать морфологию и функциональную активность продукции NO в сторону M1 фенотипа, и напротив, при увеличении концентрации сыворотки – в сторону M2 фенотипа.

Первый вопрос, который возникает при анализе полученных результатов: какой из эндогенных ФРМ играл ключевую роль в репрограммировании NO-продуцирующей активности макрофагов в наших опытах? Потенциально это могли бы быть  $IFN\gamma$  – ФРМ на M1 (ФРМ1) [3], IL-4 – ФРМ2 [3], или TGF- $\beta$  – ФРМ2 [4]. Ранее было показано, что изменение концентрации TGF- $\beta$  в диапазоне изменений концентрации сыворотки влияет на один из важных маркеров M1/M2 фенотипа – продукцию NO [4]. Вместе с тем нельзя исключить роль и других ФРМ. Поэтому, на сегодняшний день, вопрос о главных факторах репрограммирования сыворотки остается открытым. Вероятно, что эксперименты с блокирующими антителами могли бы ответить на вопрос о роли разных цитокинов в репрограммирующих эффектах сыворотки.

Второй важный вопрос, – насколько значимым может оказаться репрограммирование макрофагов для иммунного ответа в целом? Дело в том, что активация макрофагов и врожденный иммунный ответ обеспечивает только первую относительно неспецифическую реакцию организма на вторжение патогенных микробов. Для успешного удаления патогена необходим запуск специфического адаптивного иммунного ответа, либо по клеточному Th1, либо по гуморальному Th2 типу. Th1 ответ обезвреживает вирусы, бактерии и раковые клетки [11], а Th2 – экстраклеточных паразитов и токсины [7]. Данные литературы позволяют считать, что фенотип макрофагов не только определяет характер врожденного иммунного ответа, но и в значительной мере предопределяет выбор между развитием Th1 или Th2 иммунными ответами. А именно:

M1 фенотип макрофагов и их провоспалительные цитокины TNF $\alpha$ , IL-12 и IFN $\gamma$  стимулируют развитие Th0 клеток в Th1 клетки, а M2 фенотип макрофагов и их противовоспалительные цитокины IL-10 и IL-4 в Th2 [15].

Использование только двух маркеров не позволяют с уверенностью оценивать репрограммирование фенотипа макрофагов. Для этого необходимо оценить изменения других характеристик макрофагов, таких как поверхностно-клеточные маркеры и продукция цитокинов.

И наконец, третий вопрос — какова возможная биологическая целесообразность репрограммирования макрофагов при разных концентрациях сыворотки?

В этой работе мы показали способность к репрограммированию некоторых структурно-функциональных свойств под действием разных концентраций сыворотки перитонеальных макрофагов. Однако, маловероятно, что эта способность является уникальной принадлежностью перитонеальных макрофагов *in vitro*. Вероятно, что макрофаги другой локализации также могут быть репрограммированы. Это предположение подтверждается нашими предварительными экспериментами на альвеолярных макрофагах (неопубликовано). Предположение о возможности репрограммирования макрофагов *in vivo* при разных концентрациях сыворотки и концепция о роли M1/M2 фенотипов макрофагов в регуляции воспалительной реакции позволяет нам в новом свете рассматривать патогенез некоторых заболеваний, связанных с ишемией, или повреждением сосудов и кровоизлиянием. Например, и инсульт, обусловленный ишемией мозговых сосудов, и инсульт, обусловленный разрывом сосудов, приводит к гибели нервных клеток. Однако иммунологические механизмы патогенеза могут быть разными. В первом случае можно предположить, что снижение количества крови, а значит снижение концентрации сыворотки в ишемизированной зоне, будет способствовать программированию макрофагов (микроглия в мозге) на провоспалительный M1 фенотип. Такое программирование очевидно имеет патогенетический характер, так как обуславливает избыточное воспаление, и в результате этого гибель нейронов. Во втором случае, в результате кровоизлияния, в микроокружении макрофагов (микроглия) возникают повышенные концентрации сыворотки. В свете наших данных, это будет способствовать репрограммированию макрофагов на M2 фенотип. Такое программирование, вероятно, имеет «терапевтический» характер, поскольку M2 фенотип усиливает процессы ремоделирования и репарации поврежденных тканей и способствует ангиогенезу [6].

Аналогичные по сути рассуждения применимы для объяснения иммунологических событий при развитии опухоли, которое сопровождается значительным прорастанием ткани новыми сосудами, при ишемии миокарда и других органов, различных ранениях с повреждением сосудов, повреждениях в легких, и других заболеваниях, сопровождающихся кровотечением, гиперемией или напротив недостаточным притоком крови — ишемией.

Гипотеза о роли репрограммирования макрофагов в патогенезе заболеваний позволяет также предложить новые мишени для коррекции нарушенного иммунного ответа и лечения заболеваний. Например, при лечении последствий инсульта, как ишемического, так и геморрагического — использовать терапию, направленную на репрограммирование макрофагов (микроглия) в сторону M2 фенотипа, а при опухолевом росте — в сторону M1. В патогенезе заболеваний легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких или саркоидоз, ключевую роль играет M1 фенотип [13, 18], а в патогенезе других, таких как бронхиальная астма — M2 фенотип [17]. Соответственно, технология «терапевтического» репрограммирования макрофагов, должна учитывать эти особенности.

В целом наши данные позволяют дополнить существующие знания о роли факторов окружающей среды в регуляции активности макрофагов и обозначить новые иммунологические подходы для лечения заболеваний, связанных с «неадекватным» воспалением, ишемическими повреждениями органов или кровоизлиянием.

## Список литературы

1. Стандарты по диагностике и лечению больных хронической обструктивной болезнью легких (ATS/ERS, пересмотр 2004 г.): Пер. с англ. / Под ред. А.Г. Чучалина. — М.: «Атмосфера», 2005. — 96 с.
2. Хаитов Р.М. Иммунология: учеб. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006.
3. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophages plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm // *Nature Immunology*. — 2010. — Vol. 11 — P. 889-896.
4. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // *The Journal of Immunology*. — 2000. — Vol. 164. — P. 6166-6173.
5. Fritz J., Murphy B.S., Sundareshan V., Cory T.J., Hayes D.I., Anstead M.I., and Feola D.J. M1 and M2 Macrophage activation. Azithromycin alters macrophage phenotype // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 2008. — Vol. 61 (3). — P. 554-560.

6. Hong W.K., Bast R.S., Hait W., Kufe D.W., Holland J.F., Pollock R.E., Weichselbaum R.R. Holland-Frei Cancer medicine, eighth edition. – PMPH-USA, Ltd., 2010. – P. 271.
7. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology. The immune system in health and disease. – Garland Science Publishing, 2005.
8. Lolmede K., Campana L., Vezzoli M., Bosurgi L., Tonlorenzi R., Clementi E., Bianchi M.E., Cossu G., Manfredi A.A., Brunelli S, Rovere-Querini P. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem-cells, relying on separate HMGB1- and MMP9-dependent pathways // Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – Vol. 85 (5). – P. 779-787.
9. Mantovani A. Macrophage diversity and polarization.: in vivo veritas // Blood. – 2006. – Vol. 108(2). – P. 408-409
10. Mantovani A., Sica A., Locati A. New vistas on macrophage differentiation and activation // European Journal of Immunology. – 2006. – Vol. 37 (1). –P. 14-16.
11. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // Trends Immunol. – 2004. –Vol. 25. – P. 677-686.
12. Martinez F.O., Gordon S., Locati A., Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177. – P. 7303-7311.
13. Pons A.R., Noguera A., Blanquer D., Sauleda J., Pons J., Aqusti A.G. Phenotypic characterization of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD // Eur Resp J. – 2005. – Vol. 25 (4). – P. 647-52.
14. Redente E.F., Dwyer-Nield L.D., Barrett B.S., Riches D.W.H., Malkinson A.M. Lung tumor growth is stimulated in IFN $\gamma$  -/- mice and inhibited in IL-4-R $\alpha$  -/- mice // Anticancer Research. – 2009. –Vol. 29 (12). – P. 5095-5101.
15. Sieling P.A., Abrams J.S., Yamamura M., Salgame P, Bloom B.R., Rea T.H., and Modlin R.L.. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy // J. Immunol. – 1993. – Vol. 150 (12). – P. 5501-5510.
16. Smith F.S., Titheradge M.A. Nitric oxide protocols // Methods in molecular biology. – 1998. – Vol. 100. – P. 171-180.
17. Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G., Abbas A.R., Ellwanger A., Koth L.L., Arron J.R., Fahy J.V. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2009. – Vol. 180 (5). – P. 388-395.
18. Zissel G., Prasse A., Muller-Quernheim J. Sarcoidosis-immunopathogenetic concepts // J. Semin Respir Crit Care Med. – 2007. – Vol. 28 (1). – P. 3-14.

*поступила в редакцию 29.04.2011  
отправлена на доработку 10.05.2011  
принята к печати 30.05.2011*