

**РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ —
НОВАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ УПРАВЛЕНИЯ ИММУННЫМ ОТВЕТОМ*****С. В. Лямина, С. В. Круглов, С. В. Калиш, И. Ю. Малышев****Московский государственный медико-стоматологический университет*

Одну из центральных ролей в развитии воспаления играют макрофаги, приобретая в зависимости от микроокружения или провоспалительный M1, или противовоспалительный M2 фенотип. Некоторые эндогенные факторы репрограммирования макрофагов (ФРМ), например TGF- β , SP-D, IL-4, INF- γ , находятся в сыворотке крови. В данной работе подтверждена гипотеза о том, что с помощью снижения и увеличения концентрации сыворотки и соответственно ФРМ в окружающей макрофагов среде можно целенаправленно репрограммировать фенотип альвеолярных макрофагов или на M1, или на M2; при этом принципиальных качественных отличий в способности к репрограммированию макрофагов мышей линий C57BL/6 и BALB/c не выявлено. Представленные данные дополняют существующие знания о роли факторов окружающей среды в регуляции активности макрофагов и обозначают новые иммунологические подходы для лечения заболеваний легких с воспалительным компонентом.

Ключевые слова: макрофаги, фенотипы макрофагов, репрограммирование, факторы репрограммирования макрофагов.

**REPROGRAMMING OF ALVEOLAR MACROPHAGES — NEW APPROACH
TO IMMUNE RESPONSE MANAGEMENT*****S. V. Lyamina, S. V. Kruglov, S. V. Kalish, I. Yu. Malyshev***

Macrophages play one of the central roles in the inflammation development obtaining pro-inflammatory M1 or anti-inflammatory M2 phenotype depending on the microenvironment. Some endogenous reprogramming macrophages factors (MRF), for example, TGF- β , SP-D, IL-4, INF- γ can be found in serum. We demonstrated that decreasing and increasing of serum concentration and MRF respectively can purposefully reprogram macrophages phenotype to M1 or M2; and alveolar macrophages of two mice lines C57BL/6 and BALB/c were practically identical in their reprogramming ability. Our findings enlarge the existing data on the role of the environment in macrophages regulation and indicate new immunologic approaches to inflammatory lung diseases treatment.

Key words: macrophages, macrophages phenotype, reprogramming, macrophages reprogramming factors.

В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в России и мире заболевания легких с воспалительным компонентом — хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), бронхиальная астма (БА), болезни органов дыхания инфекционной этиологии, саркоидоз органов дыхания — прочно занимают лидирующие позиции в структуре общей заболеваемости и смертности трудоспособного населения. Указанные заболевания вносят существенный вклад в рост нетрудоспособности, увеличение инвалидности и преждевременной смертности населения [1]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов воспаления в легких и возможности его коррекции в настоящее время приобретают особую значимость.

Общепризнано, что, в определенной степени, течение и прогноз заболеваний, а также развитие осложнений с присутствием воспалительного компонента обусловлены состоянием иммунного статуса организма [8]. Прежде всего, особое значение отводится сбалансированности клеточного Th1 и гуморального Th2 звеньев иммунного ответа. Развитие дисбаланса Th1 и Th2 звеньев иммунного ответа может способствовать и лежать в основе различных заболеваний, в том числе и бронхо-легочной системы [8].

В значительной мере направленность развития иммунного ответа либо по клеточному Th1 пути, либо

по гуморальному Th2 пути определяют главные клетки системы врожденного иммунитета — макрофаги [7].

Открытие и описание макрофагов M1 (провоспалительного) и M2 (противовоспалительного) фенотипов, вырабатывающих разный спектр Th1 и Th2 цитокинов, привело к разработке новой M1/M2 концепции роли макрофагов в иммунитете. В этой концепции качество, интенсивность и специфичность активации макрофагов зависит от природы действующего патогена и модулирующих цитокинов. При этом Th1 цитокины способствуют формированию M1 фенотипа [5], тогда как Th2 цитокины, напротив, — M2 фенотипа [5, 7]. Данные исследования обеспечили физиологическую основу для объяснения функциональной гетерогенности макрофагов, роли микроокружения в формировании фенотипа макрофагов и механизмов пластичности иммунного ответа.

В связи с этим одним из новых перспективных подходов патогенетической терапии может являться воздействие на самые начальные звенья формирования воспалительной реакции, что позволит достичь необходимой сбалансированности всех звеньев иммунного ответа на ранних стадиях патологического процесса.

Такое воздействие возможно за счет процесса репрограммирования макрофагов, то есть изменения фенотипа секреторной/функциональной активности макрофагов.

При патологических состояниях и заболеваниях фенотипическая поляризация макрофагов, то есть соотношение макрофагов фенотипов M1 и M2, может существенно изменяться, что, в свою очередь, приводит к преобладанию того или иного пути дифференцировки Т-клеток (Th1/Th2). Следовательно, в одних случаях изменение поляризации фенотипа макрофагов можно рассматривать как адекватное, способствующее выздоровлению, в других — «неадекватным», патогенетическим, способствующим прогрессированию заболевания и, возможно, приводящим к летальному исходу.

В связи с этим чрезвычайно интерес для современной медицины представляют возможные способы коррекции фенотипа и факторы репрограммирования макрофагов (ФРМ). Известно, что в сыворотке крови находятся некоторые эндогенные ФРМ, такие как TGF- β , сурфактантный белок D (SP-D), IL-4, INF- γ .

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Учитывая имеющиеся данные, можно предположить, что с помощью снижения и увеличения концентрации сыворотки и соответственно изменения концентрации ФРМ TGF- β и SP-D в окружающей макрофагов среде, можно целенаправленно репрограммировать фенотип макрофагов или на M1, или M2. Поэтому была проведена проверка этой гипотезы на альвеолярных макрофагах мышей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на культуре альвеолярных макрофагов мышей линии C57BL/6 (направленность в сторону Th1 звена иммунного ответа) ($n = 80$) и BALB/c (направленность в сторону Th2 звена иммунного ответа) ($n = 80$). Мыши обеих линий были сопоставимы по возрасту (8—10 недель), весу [(23,9 \pm 2,5) г], полу (самцы). Животные содержались в условиях аккредитованного вивария в стандартных условиях. Перед проведением эксперимента мышей наркотизировали хлоралгидратом (32,5 мг на 100 г массы тела, внутривенно). Альвеолярные макрофаги выделялись из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) мышей.

Полученную БАЛЖ с макрофагами центрифугировали при 1000 об./мин, 4 мин, при комнатной температу-

ре. Супернатант отделяли для последующего исходного определения уровня продукции цитокинов. Клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640 без сыворотки, взвесив клеток довели до нужной концентрации, делили на три пула (пул 0, пул 1 и пул 2) и размещали в плоскодонные лунки 48 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%-й 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 — при пониженной — 0 % с целью репрограммирования на M1 фенотип, а пул 2 — при повышенной — 40 % с целью репрограммирования на 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.

В экспериментах для активации макрофагов и оценки функциональной активности после 12-часовой процедуры репрограммирования добавляли липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг/мл на 24 часа. Для морфологической характеристики всего пула макрофагов макрофаги культивировали 24 часа, после чего оценивали 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 полях зрения лунки, и определяли уровень продукции цитокинов в культуральной среде (проточная цитометрия, Beckman Coulter, FC500, FlowCytomix human Th1/Th2 11plex BMS810FF).

Об успешности процесса репрограммирования судили по таким критериям, позволяющим определить фенотип макрофагов, как изменение формы клеток и продукция макрофагальных цитокинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После 24 часов культивирования с разными концентрациями сыворотки были получены морфологические отличия макрофагов (рис. 1).

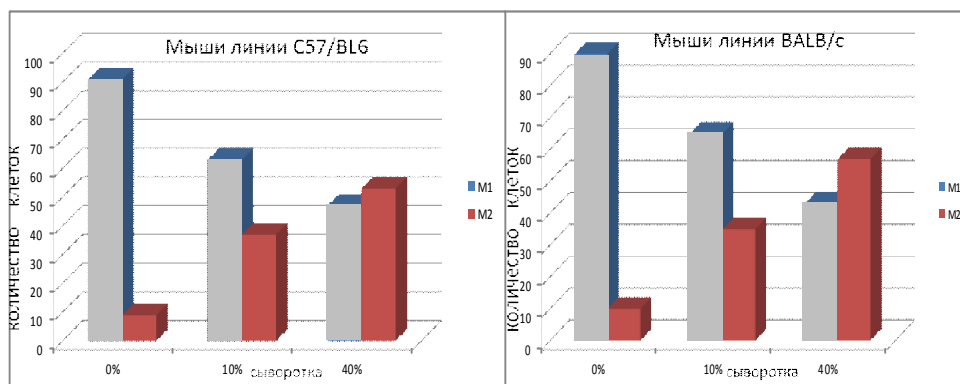


Рис. 1. Влияние концентрации сыворотки (0, 10, 40 %) в культуральной среде на количество макрофагов с круглой (M1) и расплющенной фибробластоподобной (M2) формой

Для макрофагов мышей линии C57BL/6 увеличение сыворотки в культуральной среде с 0 до 40 % приводило к достоверному увеличению клеток с фибробластоподобной формой с 9 до 53 %. Данная форма клеток характерна для M2 фенотипа, следовательно, наблюдаемые морфологические изменения подтверждают репрограммирование макрофагов в сторону M2 фенотипа в этой культуральной среде. Соответственно морфологический индекс (соотношение количества клеток с M2 фенотипом к количеству клеток с M1 фенотипом) менялся с 0,09 до 1,13 (рис. 2).

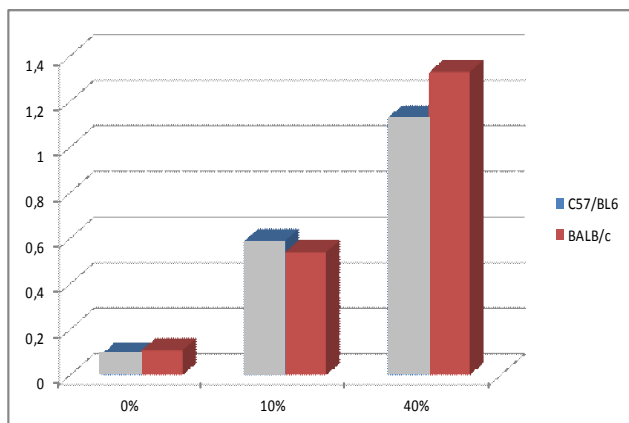


Рис. 2. Влияние концентрации сыворотки (0, 10, 40 %) в культуральной среде на значение макрофагального индекса у мышей линии C57/BL6 и BALB/c после стимуляции ЛПС

Напротив, снижение содержания сыворотки в культуральной среде с 40 до 0 % приводило к увеличению клеток округлой формы с 47 до 91 %, что подтверждает репрограммирование макрофагов в сторону M1 фенотипа. Соответственным образом морфологический индекс снижался с 1,13 до 0,09 (рис. 2).

Аналогичные изменения происходили и с макрофагами, выделенными из мышей линии BALB/c (рис. 1). При возрастании концентрации сыворотки в культуральной среде с 0 до 40 % количество клеток фибробластоподобной формы возрастало с 10 до 57 %, морфологический индекс увеличивался с 0,11 до 1,33, что также подтверждает репрограммирование макрофагов в сторону M2 фенотипа.

Направленность процесса репрограммирования и его успешность подтверждалась определением уровня цитокинов — с этой целью изучалась продукция Th1 цитокинов провоспалительного профиля — IL-1 α , IL-2, IL-6, INF- γ (рис. 3). При увеличении концентрации сыворотки с 0 до 40 % у мышей линии C57/BL6 и мышей линии BALB отмечалось достоверное снижение уровня продукции провоспалительных цитокинов, что подтверждает направленность репрограммирования макрофагов в сторону M2 фенотипа, для которого характерно преобладание продукции Th2 цитокинов — противовоспалительных.

По результатам проведенных экспериментальных работ, не было обнаружено принципиальных качествен-

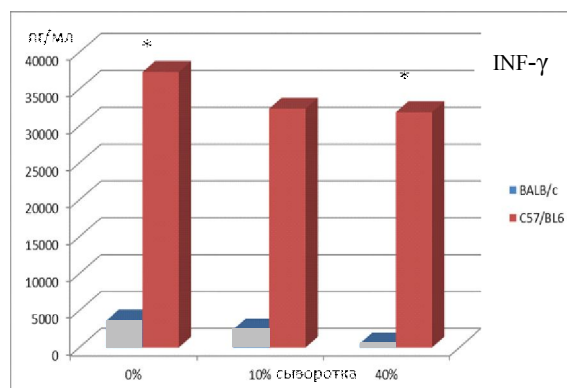
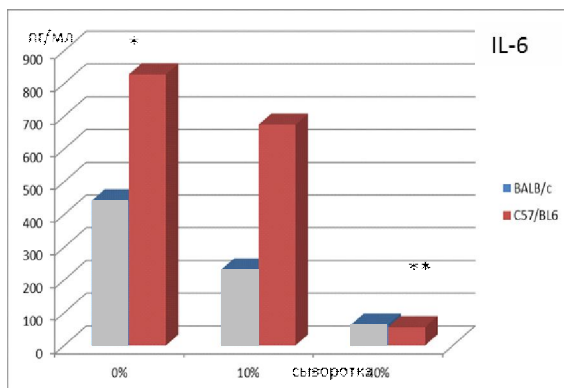
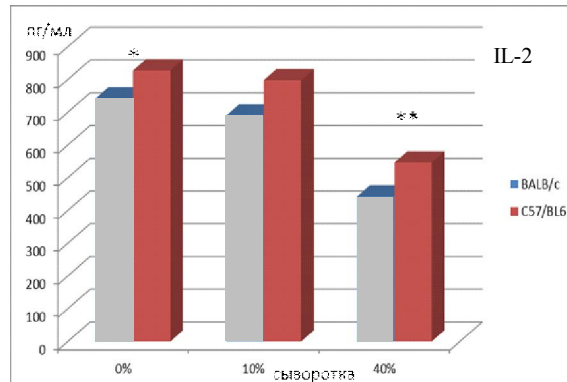
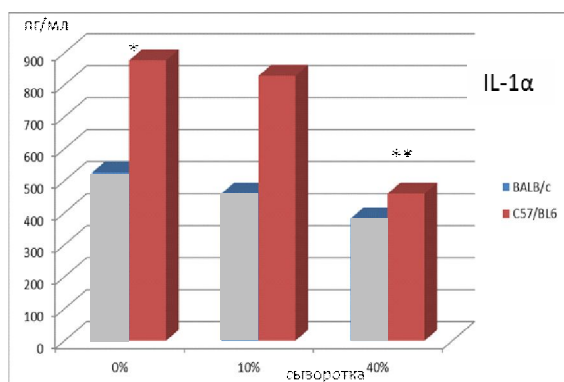


Рис. 3. Влияние концентрации сыворотки (0, 10, 40 %) в культуральной среде на продукцию цитокинов у мышей линии C57/BL6 и BALB/c после стимуляции ЛПС

ных отличий в способности к репрограммированию макрофагов у мышей линии C57BL/6 и BALB/c. Обращает на себя внимание лишь то, что во всех случаях продукция цитокинов макрофагами у мышей линии C57BL/6 была выше, чем макрофагами мышей линии BALB/c. Данный феномен объясняется тем, что макрофаги C57BL/6 генетически более склонны к проявлению M1 фенотипа, BALB/c — M2 фенотипа [4].

Представленные данные подтвердили нашу гипотезу о том, что с помощью увеличения концентрации сыворотки в среде можно репрограммировать морфологический и функциональный фенотип альвеолярных макрофагов в сторону M2 фенотипа и, напротив, с помощью снижения концентрации сыворотки — в сторону M1 фенотипа. Однако имеется ряд вопросов.

При анализе полученных результатов возникает вопрос: какой из эндогенных ФРМ играл ключевую роль в репрограммировании макрофагов в проведенных экспериментах? Потенциально, в сторону M1 фенотипа макрофаги могли репрограммироваться под воздействием IFN- γ — ФРМ на M1 (ФРМ1) [2], IL-4 — ФРМ2 [2] или TGF- β — ФРМ2, также нельзя исключать роли и сурфактантного белка [3]. Кроме того, ранее Mills C. D. и соавт. показано, что изменение TGF- β в диапазоне изменений концентрации сыворотки влияет на один из важных маркеров M1/M2 фенотипа — продукцию NO. Вместе с тем нельзя исключить роль и некоторых других ФРМ. Поэтому в настоящее время вопрос о главных факторах репрограммирования сыворотки остается изучаемым. Вероятно, что эксперименты с блокирующими антителами могли бы ответить на вопрос о роли TGF- β , IFN- γ , IL-4 или SP-D в репрограммирующих эффектах сыворотки.

Другой важный вопрос: насколько значимым может оказаться репрограммирование макрофагов для иммунного ответа в целом? Ответ содержится в следующем объяснении. Активация макрофагов и врожденный иммунный ответ обеспечивают 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. При реализации Th1 звена иммунного ответа в основном обезвреживаются вирусы, бактерии и раковые клетки, а Th2 — экстраклеточные паразиты и токсины [4]. 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, именно: M1 фенотип макрофагов и их провоспалительные цитокины стимулируют развитие Th0 клеток в Th1 клетки, а M2 фенотип макрофагов и их противовоспалительные цитокины в Th2.

Таким образом, есть все основания предполагать, что с помощью представленной в этой работе технологии репрограммирования макрофагов можно корригиро-

вать не только врожденный иммунный ответ, но и управлять вектором развития адаптивного Th1/Th2 ответа.

И, наконец, третий вопрос: какова биологическая целесообразность репрограммирования макрофагов разными концентрациями сыворотки? Ответ на этот вопрос определен результатами исследования. В данном исследовании мы показали способность к репрограммированию альвеолярных макрофагов под действием различных концентраций сыворотки. Аналогичные эксперименты были проведены нами на перитонеальных макрофагах мышей линий C57/BL6 и BALB/c (данные не опубликованы). Полученные результаты позволяют с определенной степенью уверенности говорить о способности к репрограммированию макрофагов в аналогичных условиях в целом. Возможность репрограммирования макрофагов с помощью разных концентраций сыворотки и концепция о роли M1/M2 фенотипов макрофагов в регуляции воспалительной реакции позволяет нам в новом свете рассматривать патогенез заболеваний с воспалительным компонентом.

Гипотеза о роли репрограммирования макрофагов в патогенезе заболеваний позволяет предложить новые мишени для коррекции нарушенного иммунного ответа и лечения заболеваний. В патогенезе заболеваний легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких или саркоидоз, ключевую роль играет M1 фенотип [9, 11], а в патогенезе других, таких как бронхиальная астма, — M2 фенотип [10]. Соответственно технология «терапевтического» репрограммирования макрофагов должна учитывать эти особенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, полученные данные позволяют дополнить существующие знания о роли факторов окружающей среды в регуляции активности макрофагов и обозначить новые иммунологические подходы для лечения заболеваний с воспалительным компонентом и дисбалансом в системе Th1/Th2 ответов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стандарты по диагностике и лечению больных хронической обструктивной болезнью легких (ATS/ERS, пересмотр 2004 г.) / Под ред. А. Г. Чучалина. Пер. с англ. — М.: «Атмосфера», 2005. — 96 с.
2. Biswas S. K., Mantovani A. // *Nature Immunology*. — 2010. — Vol. 11. — P. 889—896.
3. Gow A., Guo C. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2011. — Vol. 183. — P. A1085.
4. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. // *The immune system in health and disease*: — Garland Science Publishing, 2005.
5. Mantovani A. // *Blood*. — 2006. — Vol. 108 (2). — P. 408—409
6. Mantovani A., Sica A., Locati A. // *European Journal of Immunology*. — 2006. — Vol. 37(1). — P. 14—16
7. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. // *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1 (13). — P. 453—461.
8. Oosterhout A. J. M., Motta A. C. // *Eur Respir J.* — 2005. — Vol. 25. — P. 591—593.

9. Pons A. R., Noguera A., Blanquer D., et al. // Eur Resp J. — 2005. — Vol. 25 (4). — P. 647—652.

10. Woodruff P. G., Modrek B., Choy D. F., et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2009. — Vol. 180 (5). — P. 388—395

11. Zissel G., Prasse A., Muller-Quernheim J. // J. Semin Respir Crit Care Med. — 2007. — Vol. 28 (1). — P. 3—14.

Контактная информация

Лямина Светлана Владимировна — к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий Московского государственного медико-стоматологического университета, e-mail: sylvvs@mail.ru

УДК 616.314-06; 616.314-07

ОЦЕНКА КРИСТАЛЛОГРАММ ФАЦИЙ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВЕРХУШЕЧНОМ ПЕРИОДОНТИТЕ

Н. Н. Соломатина

Ульяновский государственный университет

В работе предложено использование метода анализа кристаллизации биологических жидкостей для оценки состояния ротовой полости. Предложены диагностические критерии, определенные в фациях ротовой жидкости при хроническом верхушечном периодонтите. Показана структура ротовой жидкости у здоровых лиц.

Ключевые слова: ротовая жидкость, периодонтит, кристаллизация, фация.

ESTIMATION OF ORAL CAVITY FACIA CRYSTALLOGRAM IN CHRONIC APICAL PERIODONTITIS

N. N. Solomatina

The article suggests using the method of analysis of biological fluid crystallization to estimate the state of oral cavity. Diagnostic criteria determined in the facia of oral cavity in chronic apical periodontitis are suggested. The composition of oral fluid in healthy people is shown.

Key words: oral fluid, periodontitis, crystallization, facia.

Хроническая очаговая инфекция в околоверхушечных тканях зубов является важнейшей проблемой терапевтической и хирургической стоматологии. Несмотря на многочисленные исследования в этой области [1, 4], ее актуальность не снижается. Известно, что в 99 % случаев причиной флегмон челюстно-лицевой области является воспаление верхушечного периодонта [6, 7].

В структуре стоматологических заболеваний на долю хронического верхушечного периодонтита приходится 60—70 %, его высокая распространенность в большинстве случаев является результатом некачественного эндодонтического лечения [5]. Деструктивные формы периодонтита до настоящего времени остаются основной причиной удаления зубов и могут привести к развитию таких серьезных осложнений, как периодонтит, флегмона, остеомиелит [2].

В современной стоматологической практике применяют как традиционные, так и новые методы, учитывающие различные морфофункциональные показатели организма. К таким методам относится анализ морфологии кристаллограмм ротовой жидкости (П. А. Леус, 1977) и способ клиновидной дегидратации ротовой жидкости Шабалина В. Н. и Шатохиной С. Н. (1986), сущность которых заключается

в получении сухой пленки (фации) ротовой жидкости на предметном стекле.

Слюна является биологически активной жидкостью, которая обеспечивает контроль за состоянием полости рта, регулировки и поддержания целостности твердых и мягких тканей полости рта [9]. Морфологическая картина биологической жидкости дает адекватное отражение как физиологических, так и патологических изменений, происходящих в структурах живых организмов. Определенные патологические отклонения вызывают соответствующие изменения морфологической картины ротовой жидкости. В результате структуры приобретают новые признаки, которые рассматриваются как патологические и могут использоваться как показатели степени декомпенсации, характера течения патологического процесса и эффективности принимаемых терапевтических воздействий, то есть являются морфологическими маркерами. Однако анализ кристаллограмм фаций ротовой жидкости не дает возможности полностью исключить рентгенографию, но может быть применен для уточнения диагноза и контроля проводимого лечения.

В настоящее время метод изучения морфологии биологических жидкостей используют в диагностике заболеваний мочевыделительной системы, глаз, суставов, желчного пузыря, репродуктивной системы, оценки характера раневого процесса.