

УДК 616.612.017.1

ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТАРНОЙ И МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ M1 И M2 ФЕНОТИПОВ

¹Лямина С.В., ¹Веденикин Т.Ю., ¹Круглов С.В., ¹Шимшелашвили Ш.Л.,
²Буданова О.П., ^{1,2}Мальшев И.Ю.

¹ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,
Москва, e-mail: svlvs@mail.ru;

²УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Значимую роль в инициации и развитии воспалительных реакций в легких играют альвеолярные макрофаги – одни из центральных клеток системы врожденного иммунитета. Важными компонентами врожденного ответа являются способность макрофагов к фагоцитированию и их миграционная активность. Альвеолярные макрофаги провоспалительного M1 фенотипа, выделенные от мышей линии C57/BL6, обладают большей фагоцитарной активностью по отношению к *S. aureus* по сравнению с выделенными от мышей линии BALB/c альвеолярными макрофагами противовоспалительного M2 фенотипа. При сравнительном анализе миграционной активности установлена альтернативная зависимость показателя активности от типа используемого хемоаттрактанта.

Ключевые слова: макрофаги, фенотипы макрофагов, фагоцитоз, миграционная активность

CHARACTERISTICS OF PHAGOCYtic AND MIGRATION ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES OF M1 AND M2 PHENOTYPES

¹Lyamina S.V., ¹Vedenikin T.Y., ¹Kruglov S.V., ¹Shimshelashvili S.L.,
²Budanova O.P., ^{1,2}Malyshev I.Y.

¹State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Moscow State University of Medicine and Dentistry» Ministry of Public Health and Social Development of Russian Federation, Moscow, e-mail: svlvs@mail.ru;

²Institution of Russian Academy of Medical Sciences Research Institute of General Pathology and Pathophysiology Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Alveolar macrophages are one of the key cells in the innate immunity of the organism and play significant role in initiation and development of inflammatory reactions in lungs. The ability of macrophages to migrate and phagocytose are the important components of the innate immune response. Proinflammatory alveolar macrophages of M1 phenotype, isolated from C57/BL6 mice possess more phagocytic activity in relation to *S. aureus* than macrophages of M2 antiinflammatory phenotype isolated from BALB/c mice. Comparative analysis of migration activity of macrophages showed alternative dependence of activity index and the type of chemoattractant used.

Keywords: macrophages, macrophages phenotypes, phagocytosis, migration activity

Воспалительные реакции играют исключительно важную роль в развитии большого количества заболеваний легких, таких как бронхиальная астма, острый респираторный дистресс синдром и бронхолегочная дисплазия [4]. Известно, что одну из центральных ролей в инициации и развитии воспалительных реакций в легких играют альвеолярные макрофаги. При активации эти клетки продуцируют свободные радикалы, NO, цитокины, кемокины и другие медиаторы воспаления и благодаря этому запускают врожденный и адаптивный иммунный ответ и обезвреживают патогенные микробы.

В ходе иммунного ответа нативные макрофаги могут приобретать различные функциональные фенотипы [6]. Так, классический M1 фенотип характеризуется продукцией провоспалительных цитокинов и кемокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, воспалительного белка макрофагов

1 α (MIP-1 α), а также повышенной генерацией оксида азота (NO) [6; 9]. M1 макрофаги являются эффекторными клетками, которые интегрированы в Th1 ответ. Этот фенотип убивает микроорганизмы и опухолевые клетки и продуцирует большие количества провоспалительных цитокинов [9]. Альтернативный M2 фенотип макрофагов характеризуется продукцией противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и рецептор-ловушки IL-1 (IL-1ra). Функциональное предназначение M2 фенотипа состоит прежде всего в регулировании воспалительного ответа, участии в ангиогенезе, ремоделировании тканей и восстановлении иммунного гомеостаза, нарушенного воспалением.

Очевидно, что эффективность, с которой врожденный иммунитет будет удалять патогенные микробы и при необходимости стимулировать ангиогенез, ремоделирование и восстановление поврежденных тканей, существенно зависит от фагоцитар-

ной активности макрофагов, и от того, как быстро эти клетки могут приходить в очаг воспаления, т.е. от их миграционной активности.

Таким образом, способность к фагоцитированию и миграционная активность макрофагов составляют важные компоненты врожденного ответа, от которого зависит, как быстро иммунная система сможет восстановить гомеостаз, нарушенный появлением инфекции и повреждением тканей. Однако до сих пор важный вопрос о том, каковы различия фагоцитарной способности и миграционной активности M1 и M2 фенотипов макрофагов остается открытым.

Цель данной работы состояла в том, чтобы ответить на этот вопрос.

Материалы и методы исследования

Мыши

Для изучения функциональных ответов (определение фагоцитарной и миграционной активности) выделение альвеолярных макрофагов проводилось у мышей различных линий. Известно, что разные генетические линии животных могут иметь разные фенотипы макрофагов. Например, мыши линии C57/BL6 имеют M1 фенотип, тогда как мыши Balb/c – M2 фенотип [12]. Мыши линий C57/BL6 и Balb/c были получены из вивария ГБОУ ВПО МГМСУ Минздравсоцразвития России, Москва, Россия. Для исследований использовались самцы обеих линий, возраст 10–12 недель, массой 23–28 г. Исследования проводились в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP). Мыши содержались в условиях вивария, не допускающих попадание патогенных микроорганизмов.

Выделение альвеолярных макрофагов

Альвеолярные макрофаги выделялись из бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ) мышей. Предварительно мышам внутрибрюшинно вводился раствор хлоралгидрата (из расчета 32,5 мг на 100 г веса животного), впоследствии мыши умерщвлялись с помощью перерезания нижней полой вены и обескровливания. Для получения бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ) в легкие через внутритрахеальный катетер вводилось по 1 мл стерильного фосфатного буфера PBS 37 °C (у каждого животного выполнялось по 4 промывки) [7]. Полученный БАЛ центрифугировался при 1000 об/мин 4 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл среды RPMI 1640 с последующим определением количества макрофагов в камере Горяева и доведением концентрации клеток в среде RPMI 1640 до 1·10⁶/мл.

Определение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов

Определение фагоцитарной активности макрофагов производилось на взвеси клеток, полученных из бронхо-альвеолярного лаважа по методике, указанной выше. В качестве объекта фагоцитоза использовали инактивированный нагреванием штамм *Staphylococcus aureus* 9198. Бактериальную взвесь готовили из суточной культуры убитых прогреванием при температуре 56 °C в течение 1 часа микроорганизмов с последующей трехкратной отмывкой в стерильном физиологическом растворе. По стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) определяли концентрацию бактериальных клеток, доводя до 1·10⁹/мл.

В промаркированные лунки 24-луночного планшета вносили макрофаги в среде RPMI 1640 с концентрацией 1·10⁶/мл и *Staphylococcus aureus* 9198 (концентрация микроорганизмов у подготовленного штамма составляет 1·10⁹/мл) в соотношении макрофаги/стафилококк – 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000) до общего объема 1 мл/лунка. Планшет с макрофагами и микроорганизмами инкубировали в течение 3 часов при температуре 37 ± 0,5 °C при 5% CO₂. Через 3 часа лунки планшета промывались раствором Хенкса (+4 °C), высушивались при комнатной температуре в течение 30 минут с последующей фиксацией абсолютным этиловым спиртом и краской по Романовскому-Гимзе. Фагоцитарная функция макрофагов оценивалась прямым визуальным подсчетом поглощенных микробов. При использовании прямого визуального метода рассчитывался фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток от общего числа и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество микробов, захваченных одной клеткой (оценивалось только для фагоцитирующих клеток).

Определение миграционной активности макрофагов

Определение миграционной активности макрофагов производилось на взвеси клеток, полученных из бронхо-альвеолярного лаважа по методике, указанной выше, ресуспендированных в хемотаксической среде (RPMI без фенолового красного 96 мл, 1M HEPES – 1 мл, 7,5% NaHCO₃ – 2 мл, 200 mM L-глутамин – 1 мл, BSA – 0,5 г).

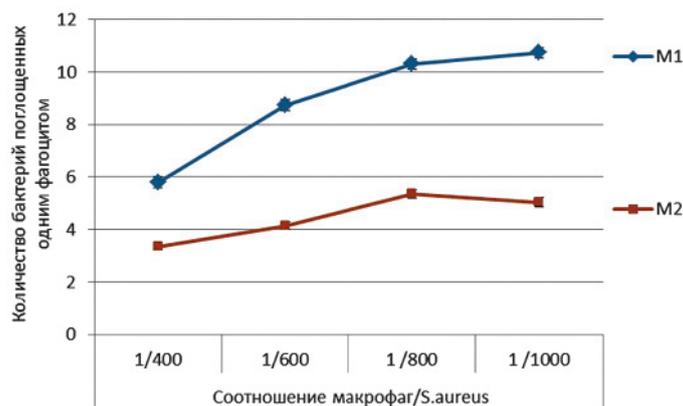
В основе методики определения миграционной активности альвеолярных макрофагов лежит принцип метода Бойдена, основанный на прохождении лейкоцитов из одной половины камеры с взвесью клеток в другую половину камеры, содержащую хемоаттрактант, и разделенных между собой мембранным фильтром. Анализ хемотаксиса проводился непосредственно по методике Neuge Probe Protocol [5].

В нижние промаркированные микроячейки камеры вносили по 30 мкл хемоаттрактанта (использовали БАЛ мышей линии C57/BL6 и Balb/c), помещали фильтр с диаметром пор 8 мкм, камеру закрывали и в верхние микроячейки камеры вносили по 100 мкл суспензии клеток (с концентрацией 1·10⁶/мл) в хемотаксической среде. Заполненную камеру инкубировали в течение 3 часов при температуре 37 ± 0,5 °C при 5% CO₂. Через 3 часа из верхних ячеек камеры проводилась аспирация клеток, ячейки заполнялись 2 mM ЭДТА в 1·PBS на 15 минут с последующей аспирацией ЭДТА. Камеру открывали и клетки с верхней стороны мембраны удаляли с помощью Q-наконечника. Затем мембрану центрифугировали при 1500 g 15 минут (при +4 °C). Окрашивание мембраны проводили азур-эозином по Романовскому в течение 15 минут. Подсчет количества мигрировавших клеток проводился в каждой ячейке под оптическим микроскопом.

Для оценки миграционной активности нами был использован индекс миграции – отношение количества мигрировавших клеток к количеству немигрировавших в одной лунке.

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке представлены данные о фагоцитарной активности макрофагов двух фенотипов в зависимости от соотношения количества бактерий на один макрофаг.



Сравнительная оценка фагоцитарной активности макрофагов M1 фенотипа, выделенных из мышей линии C57 и макрофагов M2 фенотипа, выделенных из мышей линии BALB/c

Видно, что при всех соотношениях среднее количество бактерий, поглощенных одним M1 макрофагом, было достоверно больше, чем у M2 макрофагов. Это означает, что M1 фенотип более эффективно фагоцитирует *S.aureus*, чем M2 фенотип. При этом фагоцитарная активность M1 фенотипа больше зависела от концентрации *S. Aureus*, чем у M2 фенотипа. На графике это отражается в более крутом подъеме кривой M1, по сравнению с M2.

Дальше в таблице представлены данные о миграционной подвижности макрофагов M1 и M2 фенотипов в ответ на два разных типа хемоаттрактантов: БАЛ, выделенный из мышей линии BALB/c (БАЛ_{BALB/c}), и БАЛ из C57 (БАЛ_{C57}).

Сравнительная оценка миграционной активности макрофагов M1 фенотипа, выделенных из мышей линии C57, и макрофагов M2 фенотипа, выделенных из мышей линии BALB/c. Миграционная активность количественно оценивалась по миграционному индексу, представленному как соотношение количества мигрировавших клеток к немигрировавшим

В качестве аттрактанта использовался БАЛ от мышей линии BALB/c	
Миграционный индекс альвеолярных макрофагов мышей линии BALB/c, M ± m	Миграционный индекс альвеолярных макрофагов мышей линии C57, M ± m
1,88 ± 0,13	1,12 ± 0,12
В качестве аттрактанта использовался БАЛ от мышей линии C57	
0,93 ± 0,12	1,50 ± 0,11

Эти данные позволяют сделать несколько важных выводов.

Во-первых, сравнительная оценка миграционной подвижности M1 и M2 феноти-

пов альтернативно отличается в зависимости от того какой тип хемоаттрактанта-БАЛ был использован. Действительно, в случае, когда в качестве хемоаттрактанта используется БАЛ_{BALB/c}, активность макрофагов M2 существенно выше, по сравнению с M1 (1,88 ± 0,13 vs 1,12 ± 0,12, $p < 0,01$). В том же случае, когда в качестве хемоаттрактанта используется БАЛ_{C57}, активность макрофагов M1 существенно выше, по сравнению с M2 (1,50 ± 0,11 vs 0,93 ± 0,12, $p < 0,01$).

Во-вторых, миграционная активность M2 макрофагов, выделенных из мышей BALB/c в ответ на «родной» БАЛ_{BALB/c}, достоверно выше, чем активность M1 макрофагов, выделенных из мышей C57 в ответ на свой «родной» БАЛ_{C57} (1,88 ± 0,13 vs 1,50 ± 0,11, $p < 0,05$).

В-третьих, миграционное движение макрофагов на собственный «родной» БАЛ существенно выше, чем на «чужеродный» БАЛ. Так, миграционная активность макрофагов M2 фенотипа, выделенных из мышей BALB/c в ответ на свой БАЛ_{BALB/c} была в два раза выше, чем на чужеродный БАЛ_{C57} (1,88 ± 0,13 vs 0,93 ± 0,12, $p < 0,001$). Аналогичным образом, миграционная активность макрофагов M1 фенотипа, выделенных из мышей C57 в ответ на свой БАЛ_{C57}, была почти в полтора раза выше, чем на чужеродный БАЛ_{BALB/c} (1,50 ± 0,11 vs 1,12 ± 0,12, $p < 0,05$).

Результат того, что макрофаги M1 фенотипа, выделенные от мышей C57, обладают большей фагоцитарной активностью по отношению к *S.aureus*, по сравнению с макрофагами M2 фенотипом, выделенными от мышей BALB/c, является вполне предсказуемым. Вероятно, в значительной степени это связано с тем, что M1 макрофаги иммунологически «ориентированы» на захват внутриклеточных микробов, таких как бактерии и вирусы [2], и они, по сравнению с M2 фенотипом, имеют большее представительство микробных паттерн-распознающих рецепторов фагоцитоза [10].

M2 фенотип участвует в ремоделировании и восстановлении поврежденных тканей [1; 3], поэтому больше «ориентирован» на захват мертвых фрагментов погибших клеток или инородных неживых частичек [11]. Поэтому не исключено, что при использовании вместо *S.aureus*, например, частичек краски или латексных шариков, фагоцитоз M2 фенотипа будет более эффективен по сравнению с M1. Подтверждение этому действительно есть в литературе. Так показано, что по отношению к латексным шарикам и частицам зимозана фагоцитоз M2 фенотипа был более эффективен, по сравнению с M1 фенотипом [8; 11].

Таким образом, сравнительный вывод о фагоцитарной активности разных фенотипов макрофагов должен всегда учитывать природу фагоцитируемого агента: бактерии, частички краски, или мертвые фрагменты клеток. В нашем случае, в отношении *S.aureus* фагоцитарная активность M1 фенотипа была существенно выше, по сравнению с M2 фенотипом макрофагов.

При сравнительном анализе миграционной активности складывается аналогичная ситуация, а именно, наши данные показали, что сравнительная оценка альтернативно зависит от типа используемого хемоаттрактанта. Очевидно, что выяснение причин такой зависимости потребует подробной расшифровки состава хемоаттрактантных молекул в двух типах БАЛ и ответ на вопрос, каковы отличия между БАЛ_{BALB/c} и БАЛ_{C57} по содержанию хемоаттрактантных кемокинов, цитокинов, сурфактантных белков и др.

Очевидно, что в наших условиях, миграционная активность макрофагов зависела от двух факторов:

- 1) собственная способность макрофага того или иного фенотипа к движению;
- 2) концентрация и мощность хемоаттрактантных молекул в том или ином БАЛ.

Поэтому при сравнительной оценке миграционной активности разных фенотипов макрофагов, выделенных из разных линий животных, целесообразно использовать интегральный подход, то есть оценивать миграционную активность макрофагов в своих естественных условиях своего БАЛ. При таком подходе оказалось, что миграционная активность M2 макрофагов мышей BALB/c оказалась достоверно выше таковой для M1 макрофагов мышей C57.

И, наконец, также заслуживает внимания еще один интересный факт, что миграционная активность и M1, и M2 фенотипов существенно снижалась в ответ на чужеродный БАЛ. Это кажется странным, потому что макрофаг есть именно та клетка иммунной системы, которую «чужеродное» должно

привлекать гораздо сильнее, чем «свое». Для ответа на этот вопрос также необходимо проанализировать химический и молекулярный состав БАЛ мышей разных линий.

В целом наши результаты показали, что фагоцитарная и миграционная активность M1 и M2 фенотипов макрофагов существенно различается, однако вывод о направленности этих различий необходимо делать с учетом конкретных условий проявления этих активностей.

Список литературы

1. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling / S.F. Badylak, J.E. Valentin, A.K. Ravindra et al. // *Tissue Eng Part A*. – 2008. – Vol. 14. Issue 11. – P. 1835–42.
2. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181. – P. 3733–3739.
3. Cairo G., Locati M., Mantovani A. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization // *Haematologica*. – 2010. – Vol 95, Issue 11. – P. 1801–1803.
4. Pulmonary Immunobiology and Inflammation in Pulmonary Diseases. NHLBI Workshop Summary / D. Crapo, A.G. Harmsen, M.P. Sherman, R.A. Musson // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2000. – Vol. 162. – P. 1983–1986.
5. Frevert, Wong, Goodman et al. Rapid Fluorescence-based Measurement of Neutrophil Migration in Vitro // *Journal of Immunological Methods*. – 1998. – Vol. 213. – P. 41–52.
6. Goldmann O., von Köckritz-Blickwede M., Hölzje C. et al. Transcriptome Analysis of Murine Macrophages in Response to Infection with *Streptococcus pyogenes* Reveals an Unusual Activation Program // *Infect Immun*. – 2007. – Vol. 75, Issue 8. – P. 4148–57.
7. Lasbury, M.E., Durant P.J., Lee C.H.. Numbers of alveolar macrophages are increased during *Pneumocystis pneumonia* in mice // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50(Suppl). – P. 637–638.
8. Lay J.C., Alexis N.E., Zeman K.L., et al. In-vivo Uptake of Inhaled Particles by Airway Phagocytes is Enhanced in Mild Asthmatics Compared to Normal Volunteers // *Thorax*. – 2009. – Vol. 64. – P. 313–320.
9. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. et al. Macrophage activation and polarization // *Front Biosci*. – 2008. – Vol. 13. – P. 453–61.
10. Platt N., Haworth R., da Silva R.P., Gordon S. Scavenger receptors and phagocytosis of bacteria and apoptotic cells // *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. – 1999. – Vol. 5. – P. 71–85.
11. Stangel M., Joly E., Scolding N.J., Compston D.A.S. Normal polyclonal immunoglobulins ('IVIg') inhibit microglial phagocytosis in vitro // *Journal of Neuroimmunology*. – 2000. – Vol. 106(1). – P. 137–144
12. Tumitan A.R., Monnazzi L.G., Ghiraldi F.R. et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice // *Microbiol Immunol*. – 2007. – Vol. 51(10). – P. 1021–8.

Рецензенты:

Чеснокова Н.П., д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической физиологии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов;

Архипенко Ю.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 10.11.2011.