

# Количественная оценка фенотипической пластичности макрофагов *in vitro*: первое тестирование у здоровых некурящих, курящих лиц и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>, Лямина С.В.<sup>1</sup>, Калиш С.В.<sup>1</sup>, Буданова О.П.<sup>2</sup>, Бахтина Л.Ю.<sup>2</sup>, Манухина Е.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> — МГМСУ. Московский Государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова. Министерство образования и науки России. 127473, Москва, Россия

<sup>2</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Федеральное агентство научных организаций, 125315, Москва, Россия  
E-mail: iymalyshev1@gmail.com

В исследовании разработан метод для количественного определения фенотипической пластичности (ФП) макрофагов и использован для оценки ФП макрофагов в нормальных условиях, при действии патогенного фактора (курение) и при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Анализ ФП включает в себя четыре этапа: 1) выделение и культивирование макрофагов; 2) репрограммирование макрофагов; 3) стимуляция макрофагов и 4) определение фенотипа и ФП макрофагов. Были получены следующие результаты: 1) Курение сдвигает функциональный фенотип макрофагов в сторону M2, но увеличивает способность макрофагов к изменению фенотипа в сторону провоспалительного M1 (ФП-M1) и уменьшает возможность макрофагов к изменению фенотипа в сторону противовоспалительного M2 (ФП-M2); 2) функциональный фенотип макрофагов пациентов с ХОБЛ, в отличие от здоровых некурящих, последовательно изменяется от M2 с повышенной ФП-M1 и сниженной ФП-M2 на 1-й стадии ХОБЛ на M1 с увеличенной ФП-M2 на 3-й стадии ХОБЛ. Результаты ФП-анализа показали, что механизм, лежащий в основе преобразования компенсационных M2 макрофагов здоровых курильщиков и пациентов с ранним ХОБЛ в патогенетический M1 фенотип в терминальной стадии ХОБЛ, связан с нарушенной пластичности фенотипа M2. Результаты также позволяют предположить, что риск развития рака легких на этапе 3-й стадии ХОБЛ может быть связан с повышенной ФП-M2 альвеолярных макрофагов M1 фенотипа.

**Ключевые слова:** фенотип M1 и M2; макрофаги; репрограммирование; пластичность; иммунная реакция; хроническая обструктивная болезнь легких

## Введение

Нарушения иммунитета лежат в основе многих заболеваний, включая хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), рак, и т.д. В связи с этим, более глубокое понимание механизмов иммунологических нарушений значимо для патофизиологии и, в конечном счете, для современной медицины.

Иммунный ответ в значительной мере определяется макрофагами. Активированные патогенами макрофаги могут приобретать либо провоспалительный M1 фенотип, либо противовоспалительный M2 фенотип. Маркерами M1 фенотипа являются продукция провоспалительных цитокинов, экспрессия CD80, CD25 и округлая форма макрофагов. Макрофаги M1 интегрированы в Th1 иммунный ответ, направленный на уничтожение бактерий, вирусов и опухолевых клеток [13]. Маркеры M2 фенотипа — продукция многочисленных противовоспалительных цитокинов, экспрессия CD163, и CD206, наличие фибробластоподобной формы клеток. Макрофаги M2 интегрированы в Th2 иммунный ответ, нацеленный на уничтожение экстраклеточных паразитов и способствующий репарации тканей, развитию кровеносных сосудов и росту опухолей [13]. Способность макрофага к изменению фенотипа с целью последующего подавления инфекции называют «фенотипичной пластичностью» (ФП), а процесс изменения фенотипа — «репрограммированием» [21]. Однако простые и надежные методы

оценки фенотипической пластичности (ФП) не были доступны до последнего времени. Оценка у макрофагов ФП может дать представление о патогенезе заболевания. Для факторов, которые способны вызывать смещение фенотипа макрофага в сторону M1 или M2, мы предложили использовать аббревиатуры ФР (фактор репрограммирования)-M1 и ФР-M2 соответственно. К ФР-M1 относятся, например, IFN- $\gamma$  и использование низких концентраций сыворотки, тогда как ФР-M2 включают IL-4 и сыворотку в высоких концентрациях [13, 14].

Оценка ФП макрофагов поможет более глубоко понять патогенез заболеваний. Тем не менее, простые и надежные методы для проведения такой оценки до сих пор не были разработаны. В данном исследовании мы преследовали две цели:

- 1) разработать метод количественной оценки ФП макрофагов;
- 2) использовать оценку ФП для анализа пластичности макрофага в нормальных условиях, при действии патогенного фактора (курение), и при развитии заболевания (ХОБЛ).

## Материалы и методы

Альвеолярные макрофаги выделялись из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) здоровых некурящих, здоровых курящих добровольцев и курящих пациен-

тов с ХОБЛ. Бронхо-альвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ) получена у 41 пациента с ХОБЛ 1-й стадии ( $48,6 \pm 3,0$  лет, 7 мужчин и 5 женщин), 2-й стадии ( $58,0 \pm 1,3$  года, 11 мужчин и 4 женщины) и 3-й стадии ( $58,6 \pm 2,0$  лет, 12 мужчин и 2 женщины) и у 19 чел. без клинических признаков заболевания, из них 9 курящих ( $51,83 \pm 3,5$  года, 7 мужчин и 3 женщины) и 10 некурящих здоровых ( $53,3 \pm 2,5$  года, 6 мужчин и 3 женщины) добровольцев. Индекс курильщика составлял  $59,0 \pm 4,2$  пачка/лет для здоровых курильщиков ( $n = 9$ ),  $58,7 \pm 3,9$  пачка/лет для пациентов с ХОБЛ 1-й стадии ( $n = 12$ ),  $61,3 \pm 5,2$  года пакета для пациентов с ХОБЛ 2-й стадии ( $n = 15$ ), и  $62,6 \pm 2,1$  для пациентов с ХОБЛ 3-й стадии ( $n = 14$ ).

ХОБЛ диагностировалась в соответствии с клиническими рекомендациями Глобальной инициативы по obstructивной болезни легких, 2007 (GOLD, 2007). Все пациенты подписали форму информированного согласия для участия в исследовании. Все группы исследования были сопоставимы по полу и возрасту.

Критериями исключения из исследования были: острый инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, стадии 2В и 3 сердечной недостаточности, нарушения ритма сердца, гипертонические кризы, острое нарушение мозгового кровообращения, дыхательная недостаточность 3-й степени, злокачественные опухоли, туберкулез, острые инфекционные заболевания, коллагенозы с изменениями дыхательной функции, нарушения коагуляции, сахарный диабет, беременность или кормление грудью, возраст моложе 18 или старше 70 лет.

Критерии включения пациентов с ХОБЛ 1-й и 2-й стадий в исследование: мужчины и женщины в возрасте 18—70 лет, статус курения, наличие диагностических критериев ХОБЛ (рекомендации GOLD, 2007); ремиссия на момент включения в исследование у пациентов, не использовавших гормональные препараты в течение по крайней мере 6 мес. до включения в исследование.

Контрольная группа включала добровольцев женского и мужского пола в возрасте 18—70 лет, без явных клинических признаков заболевания, любых поражений органов дыхания или любых критериев исключения, независимо от статуса курения, не использовавших гормональные препараты в течение по крайней мере 6 месяцев до включения в исследование.

Лечение пациентов проводилось в соответствии с клиническими рекомендациями с учетом клинического статуса и симптомов заболевания. Пациенты с диагностированной ХОБЛ 1-й и 2-й стадий использовали ингаляционные антихолинэргические препараты, а также бета2 агонисты короткого и пролонгированного действия; пациенты с ХОБЛ 3-й стадии в дополнение к перечисленным препаратам использовали ингаляционные глюкокортикостероиды (средние дозы составляли 1600—2000 мкг/день в пересчете на беклометазона дипропионат).

Все участники исследования подписывали форму информированного согласия. Исследование было выполнено в соответствии с принципами Надлежащей Лабораторной Практики и Надлежащей Клинической Практики [6, 7].

#### **Выделение и культивирование альвеолярных макрофагов**

Альвеолярные макрофаги выделялись из БАЛЖ. Интраназальный бронхоскоп вводился в медиальный сегмент средней доли правого легкого. Через катетер вводилось 6 порций физиологического раствора (по 20 мл), каждая

порция немедленно аспирировалась [20]. Собранный БАЛЖ центрифугировался в течение 4 мин при 1000 об/мин. Супернатант удалялся, а клеточный осадок повторно ресуспендировался с питательной средой RPMI-1640 [16]. Суспензия макрофагов распределялась в лунки 48-луночного плоскодонного планшета,  $0,5 \times 10^6$  клеток в 0,5 мл среды в каждой лунке. Клетки в планшете культивировались при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в RPMI-1640, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

#### **Определение фенотипа макрофагов**

Для оценки фенотипа макрофага используются два типа маркеров: рецепторный — экспрессия CD80 и CD206 [2] и функциональный — продукция цитокинов [13].

Рецепторный фенотип определялся по соотношению экспрессии CD80 (M1 маркер) к CD206 (M2 маркер) на макрофагах [2, 14]. Оценка экспрессии CD маркеров проводилась на проточном цитофлуориметре (Beckman Coulter, Chicago, USA) с помощью моноклональных антител к CD80 и CD206 (BD Pharmingen, San Jose, USA) согласно инструкции производителя.

Функциональный фенотип определялся по соотношению концентрации IL-12 (маркер M1) к IL-10 (маркер M2) [4]. Концентрация цитокинов измерялась методом проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter, Chicago, USA) с использованием набора BMS810FF согласно инструкции производителя.

#### **Статистический анализ**

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft). Достоверность различий определялась с использованием t-критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Результаты**

#### **1. Разработка метода оценки ФП**

##### **1.1. Обоснование оценки ФП**

При разработке метода оценки ФП были приняты во внимание три условия. Во-первых, фенотип макрофага может изменяться в сторону M1 или M2. Следовательно, возможно определение двух диапазонов ФП: способность макрофага к изменению его фенотипа в сторону M1 (ФП-M1) и в сторону M2 (ФП-M2). Во-вторых, определение двух типов фенотипа макрофага позволяет оценить и 2 типа ФП — рецепторного и функционального. В-третьих, об изменении фенотипа может свидетельствовать как изменение M1 маркеров, так и M2 маркеров, или обоих. Поэтому, при определении изменения фенотипа необходимо учитывать изменение соотношения между M1 и M2 маркерами (M1/M2 или соотношение M2/M1).

Предлагаемый метод оценки ФП включает четыре шага:

- 1) выделение и культивирование макрофага;
- 2) репрограммирование макрофага;
- 3) стимуляция/активация макрофага;
- 4) определение фенотипа макрофага и ФП.

## 1.2. Репрограммирование макрофагов

Процедура репрограммирования использовалась для изменения фенотипа макрофага в сторону M1 и оценки ФП-M1 или в сторону M2 и оценки ФП-M2. Для репрограммирования в сторону M1 фенотипа была использована 0% FBS (ФП-M1), а для репрограммирования в сторону M2 фенотипа — 40% FBS (ФП-M2). Возможность репрограммирования макрофагов с помощью различных концентраций FBS была продемонстрирована ранее [14]. 10% FBS — стандартная концентрация культивирования клеток [3;5]. Также для репрограммирования макрофага можно использовать ЛПС, IFN- $\gamma$  и IL-13 [13, 14, 21].

На следующем этапе мы проводили активацию репрограммированных макрофагов.

## 1.3. Стимуляция/активация макрофагов

Для данного исследования мы выбрали липополисахарид (ЛПС) как активатор макрофагов [21]. Макрофаги были активированы инкубацией с ЛПС в концентрации 500 нг/мл в течение 24 ч [21].

## 1.4. Определение фенотипической пластичности макрофагов

После определения фенотипа макрофага (см. выше раздел «Определение фенотипа макрофага»), вычислялась ФП. ФП-M1 определялась как процентное изменение в соотношении M1/M2 при действии ФР-M1, а ФП-M2 определялась как процентное изменение в соотношении M2/M1 при действии ФР-M2. Отношение маркера фенотипа в стандартных условиях культуры (10%-ный FBS) было взято за 100%.

## 2. Метод оценки ФП для определения пластичности макрофагов в нормальных условиях (некурящие добровольцы), при воздействии патогенов (курение) и при заболевании (курящие пациенты с ХОБЛ)

### 2.1. Оценка рецепторного фенотипа и рецепторной пластичности

Рецепторные маркеры фенотипа в отличие от цитокинового маркера (который может быть определен только при культивировании клетки) позволяют оценивать фенотип новых изолированных макрофагов непосредственно после выделения макрофагов из БАЛЖ без культивирования. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 1. У здоровых некурящих добровольцев соотношение маркера CD80 фенотипа M1 к маркеру CD206 фенотипа M2 составило 0,09. У здоровых курильщиков без клинических симптомов заболевания легких это соотношение было выше, что указывает на изменение альвео-

лярного фенотипа макрофага курильщиков по отношению к фенотипу M1. По мере развития ХОБЛ прогрессивно возрастает преобразование фенотипа макрофагов в сторону M1. В результате, у пациентов с третьей стадией ХОБЛ соотношение M1/M2 было в 8,7 раза выше (0,78 к 0,09, см. табл. 1) по сравнению со здоровыми некурящими добровольцами.

Далее оценивался рецепторный фенотип альвеолярных макрофагов и их пластичность в культуре клеток (табл. 2). Показано, что курение не затрагивало рецепторный фенотип CD80/CD206 альвеолярных макрофагов, культивируемых при 10% FBS.

При ХОБЛ стадии 1 CD-M1/M2 соотношение составило 0,54, на стадии 2 — также 0,54, а на стадии 3 — 0,76, что существенно превышает показатели для здоровых некурящих (табл. 2). Таким образом, ХОБЛ ассоциирована со значительным увеличением числа макрофагов с рецепторным фенотипом M1.

При воздействии на макрофаги здоровых некурящих лиц ФР-M1 соотношение CD-M1/M2 увеличилось на 158,8% (табл. 2), что характерно для рецепторной ФП-M1. При воздействии на макрофаги здоровых некурящих лиц ФР-M2 соотношение CD-M2/M1 возрастало на 253,5%, что свойственно рецепторной ФП-M2. В группе здоровых курильщиков рецепторная ФП-M1 составила 121,0%, а ФП-M2 — 79,2% (табл. 2). Следовательно, курение не затрагивает рецепторный фенотип макрофага, но уменьшает M1- и M2-пластичность рецепторов. Таким образом, рецепторный фенотип альвеолярных макрофагов у здоровых курильщиков может быть определен как ригидный фенотип со сниженной ФП-M1 и ФП-M2 по сравнению с макрофагами здоровых некурящих лиц.

Связанное с курением нарушение рецепторной пластичности усиливается при ХОБЛ (табл. 2). Таким образом, рецепторный фенотип альвеолярных макрофагов у курящих пациентов с ХОБЛ может быть определен как ригидный фенотип M1 со сниженной ФП-M1 и ФП-M2 по сравнению с макрофагами здоровых некурящих лиц.

### 2.2. Оценка функционального фенотипа и функциональной фенотипической пластичности

Соотношение продукции M1/M2 цитокинов у макрофагов здоровых некурящих лиц составляло 0,48 (табл. 3). Курение приводило к снижению соотношения до 0,06, то есть существенным образом смещало функциональный фенотип макрофага в сторону M2.

При ХОБЛ 1-й и 2-й стадии отмечено снижение продукции IL-12 и IL-10, соотношение M1/M2 составляло 0,05. При 3-й стадии ХОБЛ отмечено более выраженное снижение продукции IL-10 и IL-12, а соотношение продукции цитокинов M1/M2 увеличилось до 0,66 и превысило показатель здоровых некурящих лиц (0,48). Таким

Таблица 1

### Экспрессия поверхностных CD маркеров фенотипа после выделения альвеолярных макрофагов у здоровых некурящих, здоровых курящих лиц и курящих пациентов с ХОБЛ

Рецепторные CD маркеры	Курящие пациенты с ХОБЛ			Здоровые	
	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Курящие	Некурящие
CD80 (M1 маркер), %	14,5 ± 1,5	18,6 ± 1,3	22,7 ± 1,2	8,5 ± 0,9	4,6 ± 0,9
CD206 (M2 маркер), %	30,6 ± 4,4	31,3 ± 1,3	29,1 ± 1,6	36,5 ± 1,5	47,5 ± 8,6
Соотношение M1/M2	0,47	0,59	0,78	0,23	0,09

образом, при 1-й и 2-й стадиях ХОБЛ отмечено формирование фенотипа М2 со сниженной активностью, на 3-й стадии ХОБЛ формировался фенотип М1 также со сниженной активностью.

При воздействии на макрофаги здоровых некурящих лиц ФР-М1 соотношение продукции М1/М2 цитокинов возрастало на 75,0% (табл. 3), что характерно для функциональной ФП-М1. При действии на макрофаги здоровых некурящих лиц ФР-М2 соотношение М2/М1 цитокинов увеличивалось на 1269,1% (табл. 3), что определяет функциональную ФП-М2. Альвеолярные макрофаги здоровых курящих лиц характеризовались следующими параметрами функциональной пластичности: ФП-М1 составила 200,0%, ФП-М2 — 35,3% (табл. 3).

Таким образом, курение увеличивает функциональную пластичность М1 и существенно снижает пластичность М2 по сравнению с некурящими лицами за счет смещения функционального фенотипа в сторону М2. В целом, функциональный цитокиновый фенотип альве-

олярных макрофагов здоровых курильщиков по сравнению с макрофагами здоровых некурящих лиц может быть определен как фенотип М2 с увеличенной ФП-М1 и снижением (ригидной) ФП-М2.

Установлено, что снижение функциональной пластичности макрофагов при ХОБЛ зависело от стадии заболевания (табл. 3). Функциональный фенотип альвеолярных макрофагов пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми некурящими лицами может быть определен как последовательно изменяющийся от фенотипа М2 с увеличенной ФП-М1 и снижением ФП-М2 на 1-й стадии к фенотипу М1 с увеличенной ФП-М2 на 3-й стадии.

### Обсуждение

Прежде, чем обсудить результаты, полученные в ходе оценки ФП, мы хотели бы обсудить главные преимущества и недостатки предлагаемого нового метода.

Таблица 2

#### Поверхностные CD маркеры фенотипа макрофагов и рецепторная пластичность альвеолярных макрофагов здоровых некурящих, здоровых курящих лиц и курящих пациентов с ХОБЛ в культуре клеток

Рецепторные CD маркеры	Концентрация FBS в культуральной среде	Курящие пациенты с ХОБЛ			Здоровые	
		Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Курящие	Некурящие
CD80 (M1 маркер), %	0% (ФР-М1)	21,7 ± 1,1**	24,4 ± 1,2**	29,4 ± 0,8**	11,9 ± 1,9	12,1 ± 2,2
	10% (стандарт)	20,1 ± 0,9**	18,4 ± 0,9**	22,3 ± 1,5**	8,4 ± 0,5	6,4 ± 1,5
	40% (ФР-М2)	11,3 ± 0,7**	12,5 ± 0,9**	18,3 ± 0,9**	6,1 ± 0,4**	2,6 ± 0,9
CD206 (M2 маркер), %	0% (ФР-М1)	21,8 ± 1,1*	26,3 ± 1,2	20,5 ± 1,1*	28,5 ± 1,4	27,7 ± 2,3
	10% (стандарт)	36,9 ± 1,5	33,8 ± 1,2	29,2 ± 1,2**	42,9 ± 1,3	38,0 ± 2,7
	40% (ФР-М2)	45,3 ± 0,8**	45,0 ± 1,2**	36,4 ± 1,1**	55,9 ± 1,3	54,6 ± 2,7
Соотношение М1/М2	10% FBS	0,54	0,54	0,76	0,19	0,17
Параметры пластичности		Рецепторная фенотипическая пластичность, %				
ФП-М1		83,3 ± 5,6**	72,2 ± 3,6**	88,1 ± 3,9**	121,0 ± 7,2*	158,8 ± 9,4
ФП-М2		119,1 ± 8,6**	95,6 ± 4,2**	49,6 ± 2,1**	79,2 ± 5,6**	253,5 ± 19,2

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению с макрофагами здоровых некурящих лиц (10% FBS); \*p<0,05; \*\*p<0,01

Таблица 3

#### Цитокиновые маркеры фенотипа и функциональной пластичности альвеолярных макрофагов здоровых некурящих, здоровых курящих и пациентов с ХОБЛ

Маркер	Концентрация FBS в культуральной среде	Курящие пациенты с ХОБЛ			Здоровые	
		Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Курящие	Некурящие
IL-12 (M1), пг/мл	0% (ФР-М1)	39,6 ± 2,7**	45,3 ± 3,2**	198,4 ± 21,5**	454,3 ± 29,6**	2367,7 ± 274,5
	10% (стандарт)	18,5 ± 2,7**	18,5 ± 2,8**	125,6 ± 18,6**	226,8 ± 31,1**	892,2 ± 131,0
	40% (ФР-М2)	15,7 ± 1,1**	<11,6**	45,4 ± 7,1**	185,6 ± 25,7**	376,3 ± 35,9
IL-10 (M2), пг/мл	0% (ФР-М1)	64,1 ± 4,4**	253,2 ± 26,1**	172,9 ± 16,3**	2532,3 ± 482,9	2811,2 ± 582,0
	10% (стандарт)	359,2 ± 26,2**	390,1 ± 35,2**	189,0 ± 18,0**	3901,3 ± 634,3*	1847,0 ± 314,4
	40% (ФР-М2)	742,9 ± 63,6**	432,0 ± 52,5**	1906,1 ± 214,6**	4320,5 ± 751,3*	10667,6 ± 1861,4
М1/М2	10% FBS	0,05	0,05	0,66	0,06	0,48
Параметры пластичности		Функциональный фенотип пластичности, %				
ФП-М1		1140,0 ± 67,3**	260,0 ± 19,2**	74,2 ± 4,6	200 ± 12,4**	75,0 ± 2,6
ФП-М2		143,8 ± 8,7**	76,7 ± 4,1**	2698,7 ± 152,8**	35,3 ± 2,1**	1269,1 ± 75,9

Примечание. Статистически значимые различия относительно макрофагов здоровых некурящих лиц (10% FBS); \*p<0,05; \*\*p<0,01

## 1. Преимущества и недостатки метода оценки ФП

Метод оценки ФП имеет целый ряд преимуществ.

Во-первых, оценка ФП — легкий метод оценки ФП, которая определяет одно из главных свойств клетки, способности к изменению интенсивности и направления функций клетки в зависимости от микроокружения.

Во-вторых, оценка ФП может использоваться в диагностических целях. Например, показано изменение пластичности макрофагов при прогрессировании ХОБЛ.

В-третьих, оценка ФП может иметь и прогностическое значение. Таким образом, установление снижения ФП-М2 может свидетельствовать о возможном развитии воспалительных заболеваний.

В-четвертых, оценка ФП может быть использована для выбора надлежащей терапии. Например, преднизолон, который репрограммирует макрофаги в сторону М2 фенотипа, иногда неэффективен у пациентов с воспалительными заболеваниями из-за имеющейся сниженной пластичности М2 [8]. Предварительно проведенная оценка ФП могла бы помочь предотвращению неэффективного применения преднизолона.

В-пятых, оценка ФП может быть использована для любых клеток. Например, оценка пластичности эндотелиоцитов могла бы быть использована для раскрытия новых механизмов регулирования сосудистого тонуса и причин эндотелиальной дисфункции.

В-шестых, исследователь может выбрать ФР, типы ФП и маркеры, которые будут использоваться, исходя из области интереса. Мы приводим примеры использования различных концентраций FBS как ФР и ЛПС как активатора.

В то же время новый предлагаемый метод имеет некоторые недостатки и ограничения. Во-первых, оценка ФП выполнена *in vitro* и характеризуется общими недостатками, свойственными всем методам, выполненным *in vitro* — отсутствие воспроизведения полностью естественных условий. Во-вторых, клетки, полученные из организма и переведенные в условия *in vitro*, начинают приобретать фенотип «*in vitro*» по мере постепенной «отмывки» маркеров в естественных условиях. Установлено, что экспрессия CD80 и CD206 незначительно изменялись спустя 36 часов после оценки ФП. Однако для других маркеров возможность «отмывки» фенотипа должна быть проверена заранее. В-третьих, описано достаточно много маркеров фенотипа [2]. Возникает вопрос — какой из известных маркеров следует использовать? Очевидно, что использовать необходимо ту пару М1/М2, которая отвечает цели исследования.

## 2. Какие новые данные относительно факторов риска и патогенеза ХОБЛ были получены при использовании метода оценки ФП

Значимая с точки зрения патогенеза деятельность макрофагов это продукция про- и противовоспалительных цитокинов. Имея это в виду, обсудим, в первую очередь, изменения цитокиновой пластичности в отношении этиологии и патогенеза ХОБЛ.

Во-первых, в ходе проведенного исследования установлено, что у здоровых курильщиков без клинических симптомов заболевания уже присутствуют симптомы

«ХОБЛ-подобных» расстройств врожденного иммунного ответа, а именно, М2-фенотип подвержен переходу в провоспалительный М1-фенотип. По данным других авторов, также отмечается изменение фенотипа макрофагов курильщиков в сторону М2 [11, 18]. Каковы же возможные последствия этого феномена в развитии ХОБЛ?

М2 фенотип ограничивает воспаление и способствует репарации поврежденных тканей [9, 12]. Таким образом, формирование М2-фенотипа, возможно, является компенсаторным ответом на воспалительный процесс в легких и повреждение, вызванное табачным дымом. Однако долгосрочное существование «компенсаторных» М2 макрофагов у курильщиков может привести к перепрограммированию М2-фенотипа в М1 при действии ФР-М1, таких, как целый ряд провоспалительных продуктов повреждения тканей [19] в связи с увеличением пластичности в сторону М1 и снижения пластичности в сторону М2. Такое репрограммирование может усиливать воспаление, ослаблять возможность макрофагов к репарации и способствовать развитию заболеваний легких.

Во-вторых, в ходе проведенного исследования выявлено, что на ранних стадиях ХОБЛ макрофаги обладают фенотипом М2. Как и у здоровых курящих лиц, мы рассматриваем данный фенотип как «компенсаторный» с риском преобразования в фенотип М1. Действительно, это происходит на 3-й стадии ХОБЛ.

В-третьих, в исследовании показано, что при 3-й стадии ХОБЛ М1-фенотип характеризуется увеличением ФП-М2, т.е. высокой IL-10 индуцибельностью. Так как IL-10 обладает проопухолевыми свойствами [1, 15], мы предполагаем, что данное смещение может способствовать развитию наиболее угрожающего последствия ХОБЛ — рака легких. Действительно при 3-й стадии ХОБЛ риск развития рака легких очень высок [10, 17]. Следовательно, при 3-й стадии ХОБЛ у макрофагов есть «патогенетический» фенотип, подверженный преобразованию в проопухолевый фенотип.

## Заключение

В целом, оценка ФП показала, что механизм, лежащий в основе трансформации компенсаторных М2 макрофагов здоровых курильщиков и пациентов на ранних стадиях ХОБЛ в патогенетический М1 фенотип на поздних стадиях заболевания, связан с нарушением пластичности компенсаторного М2-фенотипа. Данные, полученные с использованием метода оценки ФП, позволяют предположить, что высокий риск развития рака легких на 3-й стадии ХОБЛ обусловлен увеличением М2 пластичности альвеолярных макрофагов М1 фенотипа.

Таким образом, цель проведенного исследования достигнута, поскольку:

- 1) продемонстрирована возможность использования определения ФП для получения данных о реальных физиологических и патофизиологических процессах в организме;
- 2) разработанный способ оценки ФП позволяет получить новую научную информацию о патогенезе ХОБЛ.

## Список литературы

1. Малышев И.Ю. Гипоксия и репрограммирование иммунного ответа при развитии опухоли: центральная роль макрофагов // Патогенез. — 2011. — (3). — С. 44–45.
2. Ambarus C.A., Krausz S., van Eijk M., Hamann J., Radstake T.R., Reedquist K.A., Tak P.P., Baeten D.L. Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages // J. Immunol. Methods. — 2012. — Vol. 375(1–2). — P. 196–206.
3. Azouna N.B., Jenhani F., Regaya Z., Berraies L., Othman T.B., Ducrocq E., Domenech J. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum // Stem Cell Research & Therapy. — 2012. — 3:6. doi:10.1186/scrt97
4. Forlenza M., Fink I.R., Raes G., Wiegertjes G.F. Heterogeneity of macrophage activation in fish // Dev. Comp. Immunol. — 2011. — Vol. 35(12). — P. 1246–1255.
5. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 5th ed. — New York: Wiley-Liss, 2005. — P. 289.
6. Good Clinical Practice: Consolidated guideline, CPMP/ICH/135/95
7. Good Laboratory Practice: Regulations — 21 CFR 58
8. Ikezumi Y., Suzuki T., Karasawa T., Hasegawa H., Kawachi H., Nikolic-Paterson D.J., Uchiyama M. Contrasting Effects of Steroids and Mizoribine on Macrophage Activation and Glomerular Lesions in Rat Thy-1 Mesangial Proliferative Glomerulonephritis // Am. J. Nephrol. — 2010. — Vol. 31. — P. 273–282.
9. Jones C.V., Williams T.M., Walker K.A., Dickinson H., Sakal S., Rumballe B.A., Little M.A., Jenkin G., Ricardo S.D. M2 macrophage polarisation is associated with alveolar formation during postnatal lung development // Respiratory Research. — 2013. — 14:41. doi:10.1186/1465-9921-14-41
10. Koshiol J., Rotunno M., Consonni D., Pesatori A.C., Matteis S.D., Goldstein A.M., Chaturvedi A.K., Wacholder S., Landi M.T., Lubin J.H., Caporaso N.E. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Altered Risk of Lung Cancer in a Population-Based Case-Control Study // PLoS ONE. — 2009. — 4(10). — e7380. doi:10.1371/journal.pone.0007380
11. Lofdahl, J.M., Wahlstrom, J., Skold, C.M. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers // Clin. Exp. Immunol. — 2006. — Vol. 145(3). — P. 428–437.
12. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling // The Journal of pathology. — 2013. — Vol. 229(2). — P. 176–185.
13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Front. Biosci. — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
14. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 6166–6173.
15. Mocellin S, Marincola F.M., Young H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint // J. Leukoc. Biol. — 2005. — Vol. 78(5). — P. 1043–1051.
16. Orosi P., Nugent K. Studies of phagocytic and killing activities of alveolar macrophages in patients with sarcoidosis // Lung. — 1993. — Vol. 171(4). — P. 225–233.
17. Raviv S., Hawkins K.A., DeCamp M.M. Jr., Kalhan R. Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. — 2011. — Vol. 183, 9. — P. 1138–1146.
18. Shaykhiev R., Krause A., Salit J., Strulovici-Barel Y., Harvey B.G., O'Connor T.P., Crystal R.G. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // The Journal of Immunology. — 2009. — Vol. 183. — P. 2867–2883.
19. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122(3). — P. 787–795.
20. Thum T., Erpenbeck V.J., Moeller J., Hohlfeld J.M., Krug N., Borlak J. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and non-smokers // Environmental Health Perspectives. — 2006. — Vol. 114(11). — P. 1655–1661.
21. Zhang X., Morrison D.C. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages // J. Leukoc. Biol. — 1993. — Vol. 54(5). — P. 444–450.

Поступила 07.01.2015

## References

1. Malyshev I.Ju. Gipoksija i reprogramirovanie immunnogo otveta pri razvitii opuholi: central'naja rol' makrofagov // Patogenez. — 2011. — (3). — S. 44–45.
2. Ambarus C.A., Krausz S., van Eijk M., Hamann J., Radstake T.R., Reedquist K.A., Tak P.P., Baeten D.L. Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages // J. Immunol. Methods. — 2012. — Vol. 375(1–2). — P. 196–206.
3. Azouna N.B., Jenhani F., Regaya Z., Berraies L., Othman T.B., Ducrocq E., Domenech J. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum // Stem Cell Research & Therapy. — 2012. — 3:6. doi:10.1186/scrt97
4. Forlenza M., Fink I.R., Raes G., Wiegertjes G.F. Heterogeneity of macrophage activation in fish // Dev. Comp. Immunol. — 2011. — Vol. 35(12). — P. 1246–1255.
5. Freshney R.I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 5th ed. — New York: Wiley-Liss, 2005. — P. 289.
6. Good Clinical Practice: Consolidated guideline, CPMP/ICH/135/95
7. Good Laboratory Practice: Regulations — 21 CFR 58
8. Ikezumi Y., Suzuki T., Karasawa T., Hasegawa H., Kawachi H., Nikolic-Paterson D.J., Uchiyama M. Contrasting Effects of Steroids and Mizoribine on Macrophage Activation and Glomerular Lesions in Rat Thy-1 Mesangial Proliferative Glomerulonephritis // Am. J. Nephrol. — 2010. — Vol. 31. — P. 273–282.
9. Jones C.V., Williams T.M., Walker K.A., Dickinson H., Sakal S., Rumballe B.A., Little M.A., Jenkin G., Ricardo S.D. M2 macrophage polarisation is associated with alveolar formation during postnatal lung development // Respiratory Research. — 2013. — 14:41. doi:10.1186/1465-9921-14-41
10. Koshiol J., Rotunno M., Consonni D., Pesatori A.C., Matteis S.D., Goldstein A.M., Chaturvedi A.K., Wacholder S., Landi M.T., Lubin J.H., Caporaso N.E. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Altered Risk of Lung Cancer in a Population-Based Case-Control Study // PLoS ONE. — 2009. — 4(10). — e7380. doi:10.1371/journal.pone.0007380
11. Lofdahl, J.M., Wahlstrom, J., Skold, C.M. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers // Clin. Exp. Immunol. — 2006. — Vol. 145(3). — P. 428–437.
12. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling // The Journal of pathology. — 2013. — Vol. 229(2). — P. 176–185.
13. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Front. Biosci. — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
14. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 6166–6173.
15. Mocellin S, Marincola F.M., Young H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint // J. Leukoc. Biol. — 2005. — Vol. 78(5). — P. 1043–1051.
16. Orosi P., Nugent K. Studies of phagocytic and killing activities of alveolar macrophages in patients with sarcoidosis // Lung. — 1993. — Vol. 171(4). — P. 225–233.
17. Raviv S., Hawkins K.A., DeCamp M.M. Jr., Kalhan R. Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. — 2011. — Vol. 183, 9. — P. 1138–1146.
18. Shaykhiev R., Krause A., Salit J., Strulovici-Barel Y., Harvey B.G., O'Connor T.P., Crystal R.G. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // The Journal of Immunology. — 2009. — Vol. 183. — P. 2867–2883.
19. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122(3). — P. 787–795.
20. Thum T., Erpenbeck V.J., Moeller J., Hohlfeld J.M., Krug N., Borlak J. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and non-smokers // Environmental Health Perspectives. — 2006. — Vol. 114(11). — P. 1655–1661.
21. Zhang X., Morrison D.C. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages // J. Leukoc. Biol. — 1993. — Vol. 54(5). — P. 444–450.

Received 07.01.2015

---

## **Quantitative estimation of phenotypic plasticity of macrophages *in vitro*: the first test in healthy non-smokers, smokers persons and patients with chronic obstructive pulmonary disease**

**Malyshev I.Yu.<sup>1,2</sup>, Lyamina S.V.<sup>1</sup>, Kalish S.V.<sup>1</sup>, Budanova O.P.<sup>2</sup>, Bakhtina L.Y.<sup>2</sup>, Manukhina E.B.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> – Moscow 1state medico-stomatological University A.I.Evdokimov. The Ministry of education and science of Russia.  
127473, Moscow, Russia

<sup>2</sup> – Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of general pathology and pathophysiology», 125315. Moscow, Russia

*Immunity disorders underlie many diseases, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cancer, etc. Evaluating the macrophage phenotypic plasticity (PhP) may provide insight into disease pathogenesis. However simple and reliable methods for such evaluation have not been available so far. In this study, we were focused on 1) developing a method for quantification of macrophage phenotypic plasticity (PhP-assay), and 2) using the PhP-assay for evaluation of macrophage plasticity in normal conditions, under the action of a pathogenic factor (smoking), and in a disease (COPD). The PhP-assay includes four steps: 1) alveolar macrophage isolation and culture; 2) macrophage reprogramming; 3) macrophage stimulation; and 4) determination of macrophage phenotype and PhP. The following results were obtained. 1) Smoking shifts the macrophage functional cytokine phenotype towards M2, increases the macrophage capability for changing towards the proinflammatory M1 phenotype (PhP-M1) and reduces the macrophage capability for changing towards the anti-inflammatory M2 phenotype (PhP-M2); 2) The functional cytokine phenotype of macrophages from patients with COPD, as distinct from healthy non-smokers, successively changes from M2 with increased PhP-M1 and decreased PhP-M2 in stage 1 COPD to M1 with increased PhP-M2 in stage 3 COPD. Results of the PhP-assay showed that the mechanism underlying the transformation of compensatory M2 macrophages of healthy smokers and patients with early COPD into pathogenetic M1s in late COPD is related with disturbed plasticity of the M2 phenotype, and suggested that the risk of lung cancer in stage 3 COPD is associated with increased M2 plasticity of the alveolar macrophage M1 phenotype.*

**Key words:** *phenotype of M1 and M2 macrophages; reprogramming; plasticity; immune response; chronic obstructive pulmonary disease*