

УДК 57.085.23

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КУЛЬТУРЫ МАКРОФАГОВ КОСТНОГО МОЗГА, СТИМУЛИРОВАННЫХ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ *IN VITRO*

© 2021 г. В. А. Поздина^{1, *}, У. В. Зведенинова², М. В. Улитко^{3, 4}, И. Г. Данилова^{1, 4}, М. Т. Абидов⁵

¹Институт Иммунологии и Физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049 Россия

²Уральский Государственный Медицинский Университет, Екатеринбург, 620028 Россия

³Институт естественных наук и математики Уральского Федерального Университет, Екатеринбург, 620026 Россия

⁴Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, 620026 Россия

⁵Институт иммунологии и профилактической медицины, Любляна, 1000 Словения

*E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.2021 г.

После доработки 10.06.2021 г.

Принята к публикации 16.06.2021 г.

В работе исследовали морфометрические и иммунофенотипические характеристики макрофагов костного мозга крыс, выделенных из интактных животных и стимулированных аминоксидогидрофталазиндионом натрия (АДФН) в условиях культивирования в течение 24, 48 и 72 ч. Определяли следующие морфометрические показатели: площадь клетки, цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Пролиферативную активность оценивали по наличию маркера Ki-67. Фенотип макрофагов определяли по маркерам CD163 (M2-фенотип) и F4/80 (M1-фенотип), присутствующим на поверхности клеток. Кроме того, оценивали содержание фактора роста TGF- β в цитоплазме макрофагов. Стимуляция макрофагов АДФН в дозе 50 мкг/мл АДФН способствует росту количества CD163⁺-клеток и содержания этого маркера с увеличением срока культивирования. Действие 100 мкг/мл АДФН, наоборот, с увеличением времени культивирования приводит к повышению доли F4/80⁺-клеток в культуре и росту содержания этого маркера. Накопление TGF- β происходит к 48 ч культивирования клеток в присутствии 50 мкг/мл АДФН, и его повышенные количества сохраняются в течение 72 ч. АДФН в дозе 100 мкг/мл усиливает образование TGF- β к 48 ч, и угнетает его к 72 ч культивирования клеток с веществом. При добавлении АДФН в культуру моноцитов ускоряется созревание макрофагов, а также вещество обладает выраженным дозозависимым действием на макрофаги КМ.

Ключевые слова: макрофаги, костный мозг, аминоксидогидрофталазиндион натрия

DOI: 10.31857/S0041377121050096

Собственные макрофаги костного мозга (КМ) – клетки иммунной системы, обладающие активной подвижностью, адгезивностью и выраженной способностью к фагоцитозу, а также выполняющие ряд уникальных функций, связанных с регуляцией процесса кроветворения. Этот тип клеток имеет мезенхимное происхождение и в постнатальном онтогенезе дифференцируется из стволовой кроветворной клетки, проходя в КМ последовательно 3 стадии созревания: монобласт → промоноцит → моноцит. В настоящее время известно о 3-х основных популяциях резидентных макрофагов КМ: центральные макрофаги внутри эритробластических островков

(ЭО), популяция резидентных макрофагов КМ, участвующих в поддержании гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), или нишевые макрофаги ГСК, и остеомаки – макрофаги, выстилающие кость, включая эндост (Winker et al., 2010; Sinder et al., 2015).

Первая популяция – макрофаги внутри ЭО. Их уникальность состоит в том, что они обеспечивают выживание эритробластов во время их созревания для образования ретикулоцитов. Макрофаги ЭО также экспрессируют молекулы адгезии, такие как молекулы адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), которые опосредуют сцепление эритробластов и макрофагов ЭО (Ulyanova et al., 2011; Jacobsen et al., 2014). Функция макрофагов ЭО подразделяется на три большие категории: 1) секреция широкого спектра цитокинов и факторов роста, 2) транспорт железа и 3) фагоцитоз и деградация ядер клеток-предше-

Принятые сокращения: ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка; КМ – костный мозг; ППС – полная питательная среда; ЭО – эритробластический островок (erythroblastic island macrophages); NO – оксид азота.

ственников эритроцитов (Kawane et al., 2001; Toda et al., 2014). Макрофаги ЭО могут секретировать эритропоэтин (EPO) – фактор роста, регулирующий эритропоэз, а также другие факторы, которые способствуют эритропоэзу, включая инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) и костный морфогенетический белок-4 (BMP-4) (Liu et al., 2015; Tonkin et al., 2015). Для макрофагов ЭО характерна следующая комбинация миелоидно-макрофагальных маркеров: CD11b, F4/80, CD169, EIM-ассоциированный антиген ER-HR3 и традиционный гранулоцитарный антиген Ly6G (Sonoda, Sasaki, 2008; Chow et al., 2011; Jacobsen et al., 2014). Особенной пластичностью макрофаги ЭО не обладают в связи с узкоспециализированными функциями.

Вторая популяция – макрофаги, локализующиеся в микросреде ниши ГСК и поддерживающие ее гомеостаз (Chang et al., 2008). Их вероятная функция была оценена с использованием моделей истощения макрофагов, включая трансгенных мышей Maf1a, и моделей гематопоезического стресса (Winkler et al., 2010; Chow et al., 2011; Christopher et al., 2011). Данные свидетельствуют о том, что макрофаги этой популяции регулируют пролиферацию и созревание ГСК прямым и непрямым образом (Winkler et al., 2010; Jacobsen et al., 2014; Dutta et al., 2015; Hur et al., 2016). В частности, было продемонстрировано, что связывание рецептора CD234 эритроцитов с макрофагами ниши ГСК стабилизирует поверхностный рецептор CD82, экспрессируемый ГСК, находящимися в эндостальных артериолярных областях КМ, и способствует покою ГСК (Hur et al., 2016). Уменьшение доли макрофагов CD234⁺ в КМ, приводило к понижению доли CD82⁺ ГСК, тем самым стимулируя пролиферацию и дифференцировку этих клеток (Hur et al., 2016). Фенотип ГСК-макрофагов в настоящее время определяется следующим набором экспрессируемых маркеров: CD11b, F4/80, Ly6Gneg, CD169, VCAM-1, CD234 (Winkler et al., 2010; Jacobsen et al., 2014; Dutta et al., 2015; Hur et al., 2016).

Третья популяция – остеомаки (периостальные макрофаги) – это макрофаги КМ, которые находятся на активных участках костеобразования на эндостальной и периостальной поверхностях, формируют непрерывный слой на границе эндоста и КМ и участвуют в гомеостазе и восстановлении костей (Pettit et al., 2008; Wu et al., 2013; Sinder et al., 2015). Остеомаки также являются неотъемлемой частью анаболического действия паратироидных гормонов и могут способствовать воздействию микробиоты на кости (Cho et al., 2014; Li et al., 2016). Этот тип макрофагов экспрессирует набор общих маркеров пан-макрофагов, включая F4/80, CD115, CD68 и Mac-3, но не экспрессирует маркер остеокластов тартрат-резистентную кислотную фосфатазу (TRAP5b) или мар-

керы линии остеобластов (Chang et al., 2008; Wu et al., 2013; Jacobsen et al., 2014; Sinder et al., 2015). До сих пор нет уникальных маркеров, отличающих остеомаки от других подмножеств костномозговых макрофагов.

Моноциты и макрофаги КМ, получая сигналы от микроокружения, могут дифференцироваться в 2 основных фенотипа с промежуточными формами: провоспалительный M1 и противовоспалительный M2. Для фенотипа M1 характерно наличие маркеров CD80, CD86 и продукция цитокинов IL-12, IL-18, IL-1 β , TNF α , NO, АФК, для фенотипа M2 – наличие маркеров CD206, CD36, CD163, CD301 и продукция IL-10, IL-13 и TGF- β (Сарбаева и др., 2016; Сумина и др., 2016).

Активация макрофагов не является жестко детерминированной и стабильной. При изменении спектра стимулирующих цитокинов возможна трансформация M1-фенотипа в M2. Макрофаги, поглощая апоптозные клетки, резко снижают секрецию и синтез медиаторов воспаления CCL2, CXCL2, CCL3, CXCL1, TNF-a, MG-CSF, IL-1b, IL-8 и многократно усиливают продукцию TGF-b. Возможна и обратная трансформация фенотипа: из M2 в M1 при развитии ожирения, сахарного диабета 1 типа и панкреатита. Многие авторы ставят под вопрос существование в организме двух четко различимых популяций макрофагов M1 и M2 (Сарбаева и др., 2016). Возможность репрограммирования макрофагов в патогенезе заболеваний позволяет поставить новые цели для коррекции нарушенного иммунного ответа и лечения различных заболеваний.

В связи с этим, представляется актуальным изучение клеточного ответа макрофагов в экспериментальных условиях, при их культивировании с веществом аминодигидрофталазиндионом натрия (АДФН). Это вещество присутствует в общедоступных базах данных, его идентификационный номер в базе PubChem: 9794222, InChI Key: JKEBMURXLKGPLR-UHFFFAOYSA-N, молекулярная формула: C₈H₆N₃NaO₂. В ряде работ было показано, что это соединение воздействует на функционально-метаболическую активность макрофагов, и обладает выраженным противовоспалительным и антиоксидантным действием (Jukić et al., 2011, 2012; Danilova et al., 2017, 2020). АДФН показал свою модулирующую активность на макрофаги в наших предыдущих исследованиях (Поздина и др., 2020). Было показано, что АДФН способствует инфильтрации M2-макрофагов в поджелудочную железу, в которой они воздействовали на β -клетки островков Лангерганса, что приводило к пролиферации β -клеток и снижению уровня глюкозы при моделировании сахарного диабета 1 типа (СД1) (Danilova et al., 2017). Также было показано, что

АДФН способствует миграции СГК в кровь и зону повреждения (Danilova et al., 2020).

В настоящей работе была поставлена цель изучить особенности функционирования популяции макрофагов из КМ в условиях *in vitro* и оценить клеточный ответ и изменение морфофункциональных параметров макрофагов, подвергшихся стимуляции АДФН, для последующей коррекции воспалительных реакций, возникающих в органах-мишенях при повреждении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали макрофаги КМ, полученные из интактных самок крыс Wistar в возрасте 3 мес. и весом 237 ± 9.12 г. Макрофаги культивировали в течение 24, 48 и 72 ч. Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ 07/19 от 18.12.2019) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

Выделение макрофагов из КМ. Выведение животных из эксперимента проводили с помощью внутримышечного введения зоветила в дозе 15 мг/кг (Virbac Sante Animale, Франция). Выделение макрофагов из КМ проводили по описанной методике (Madaan et al., 2014) с изолированием и очищением бедренной кости. Очищенную кость помещали в 70%-ный раствор этилового спирта на 5 мин, отрезали эпифизы с обоих концов. Кость промывали раствором HBSS (Биолот, Россия) до тех пор, пока полость кости не становилась белой. Суспензию собирали в стерильную пробирку для центрифугирования и доводили объем до 20 мл, используя HBSS (Биолот, Россия).

Получение макрофагальной культуры. Полученную суспензию клеток центрифугировали 8 мин при 300 об./мин. Осадок суспензировали в 20 мл HBSS (Биолот, Россия) для повторного центрифугирования. После процедуры получившийся клеточный осадок ресуспензировали в полной питательной среде (ППС) и вносили на покровные стекла в чашки Петри 2 мл суспензии. Для приготовления ППС использовали культуральную среду RPMI-1640 (90% от общего объема) (Биолот, Россия), эмбриональную телячью сыворотку FBS (Биолот, Россия) (10% от общего объема среды), и гентамицин в концентрации 10 мкг/мл. Далее культивировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония).

Стимуляция макрофагов АДФН. Полученную клеточную культуру клеток делили на две группы: нестимулированные макрофаги, которые являлись контролем, и стимулированные макрофаги, к которым через 24 ч культивирования добавляли АДФН в дозе 50, 100 мкг/мл. Клетки культивировали с веще-

ством в течение 24, 48 и 72 ч. По истечению сроков культивирования в присутствии АДФН покровные стекла с клетками фиксировали в чашках Петри 10%-ным раствором формалина в течение 5 мин.

Морфометрическая характеристика макрофагов. В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки, цитоплазмы и ядра в мкм², а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Визуализацию осуществляли с помощью оптического микроскопа Leica DM2500 (Leica, Германия) и подключенной к ней камеры Leica DFC420 (Leica, Германия). Для обработки изображений использовали программу LAS Core V4.9 (Leica, Германия).

Определение фенотипических маркеров макрофагов. Для определения фенотипа макрофагов клетки окрашивали иммуноцитохимически на поверхностные маркеры F4/80 и CD163 (MA5-16624 и MA5-16658 соответственно; ThermoFisher, США). Окраска на маркер F4/80 показывает дифференцировку клеток в макрофаги. Существует ряд статей, в которых утверждается, что этот маркер является рецептором классически активированных макрофагов (типа M1) (Kristiansen et al., 2001). Белок CD163 является поверхностным маркером макрофагов противовоспалительного M2-фенотипа (Schaer et al., 2006; Шарфутдинова и др., 2014). Количество маркеров F4/80⁺ и CD163⁺ на поверхности макрофагов оценивали по показателю оптической плотности (ОП) и выражали в процентах от общего количества клеток.

Анализ образования TGF-β в цитоплазме макрофагов. Клетки окрашивали иммуноцитохимически на TGF-β – многофункциональный цитокин, принадлежащий к суперсемейству трансформирующих факторов роста. TGF-β стимулирует созревание покоящихся моноцитов в макрофаги, а также подавляет выработку воспалительных цитокинов в моноцитах и макрофагах, вероятно, из-за ингибирования NF-κB (Bletriot et al., 2015). Содержание TGF-β⁺ макрофагов оценивали по оптической плотности окраски и выражали в усл. ед.

Определение пролиферативной активности макрофагов. Пролиферативную активность оценивали по иммуноцитохимической окраске ядерного белка Ki-67. Белок Ki-67 присутствует во всех активных фазах клеточного цикла (G₁, S, G₂ и M) и необходим для пролиферации клеток, но отсутствует в покоящихся клетках (в фазе G₀). По наличию и количеству Ki-67 можно оценивать пролиферативную активность клеток (Osterud, Bjorklid, 2003). Количество Ki-67⁺-макрофагов оценивали по оптической плотности и выражали в процентах от общего количества клеток.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA.10 и SPSS. Вычисляли среднее арифметическое, ошиб-

Таблица 1. Сравнительная морфометрическая характеристика макрофагов КМ в культуре, нестимулированных (контроль) и стимулированных АДФН (50 или 100 мкг/мл)

Время, ч	S клетки, мкм ²	S ядра, мкм ²	S цитоплазмы, мкм ²	ЯЦО
Контроль				
24	146.95 ± 14.68	33.89 ± 2.08	113.05 ± 13.19	0.59 ± 0.06
48	282.01 ± 20.23 ^а	37.49 ± 1.46 ^а	243.66 ± 19.11 ^а	0.32 ± 0.02 ^а
72	265.74 ± 36.19 ^а	46.51 ± 3.51 ^{а, б}	218.68 ± 36.04 ^а	0.38 ± 0.05 ^а
АДФН, 50 мкг/мл				
24	141.91 ± 11.01	33.93 ± 1.23	107.31 ± 10.03	0.63 ± 0.04
48	256.39 ± 12.73 ^{а, г}	35.38 ± 0.98	220.24 ± 12.19 ^{а, г}	0.31 ± 0.03 ^{а, г}
72	232.16 ± 14.21 ^{а, г}	34.85 ± 1.11 ^б	196.43 ± 13.29 ^{а, г}	0.35 ± 0.02 ^{а, г}
АДФН, 100 мкг/мл				
24	125.69 ± 6.41 ^д	28.22 ± 0.88 ^{г, д}	97.47 ± 6.08 ^д	0.47 ± 0.03 ^{г, д}
48	295.96 ± 31.70 ^{а, г, д, ж}	36.96 ± 2.57 ^ж	259.02 ± 30.53 ^{а, г, д, ж}	0.20 ± 0.02 ^{а, г, д, е, ж}
72	261.95 ± 37.50 ^{а, г, д, ж}	34.59 ± 1.77 ^б	226.70 ± 36.80 ^{а, г, д, ж}	0.27 ± 0.02 ^{а, г, д, е, ж}

Примечание. S – площадь. Приводятся средние значения по группам и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^аКонтроль, 24 ч; ^бКонтроль, 48 ч; ^вКонтроль, 72 ч; ^дАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^еАДФН, 50 мкг/мл, 48 ч; ^жАДФН, 50 мкг/мл, 72 ч; ^зАДФН, 100 мкг/мл, 24 ч.

ку среднего и стандартное отклонение. Определяли достоверность различий между образцами клеток, принадлежащих к одной популяции (ранговый анализ Краскела–Уоллиса, медианный тест). Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая и морфометрическая характеристика макрофагов костного мозга. Нестимулированная культура макрофагов КМ через 24 ч культивирования представлена клетками округлой формы с небольшим количеством цитоплазмы и округлым ядром, расположенным в центре клетки (рис. 1). Площадь ядра макрофагов увеличивается с увеличением срока культивирования следующим образом: 33.89 ± 2.08 мкм² (24 ч) → 37.49 ± 1.46 мкм² (48 ч) → 46.51 ± 3.51 мкм² (72 ч). Площадь цитоплазмы ($S_{\text{цит}}$) и, следовательно, площадь клетки ($S_{\text{кл}}$) максимально увеличиваются через 48 ч культивирования ($S_{\text{кл}} = 282.01 \pm 20.23$ мкм², $S_{\text{цит}} = 243.66 \pm 19.11$ мкм²) (табл. 1).

При 24-часовом культивировании в присутствии АДФН в любой из двух концентраций клетки выгля-

дят так же, как и в нестимулированной культуре: округлая форма клеток и округлое ядро, занимающее центральное положение, площадь которого составляет 33.93 ± 1.23 и 28.22 ± 0.88 мкм² при концентрации АДФН 50 и 100 мкг/мл соответственно. Площадь цитоплазмы небольшая и составляет 107.31 ± 10.03 и 97.47 ± 6.08 мкм² при концентрации АДФН 50 и 100 мкг/мл соответственно. К 48 ч культивирования в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН клетки максимально увеличиваются в размере и почти не меняются впоследствии, меняется форма клеток и ядро смещается к периферии, появляются клетки дендритоподобной формы (рис. 1, табл. 1).

Характер изменения ЯЦО у стимулированных и нестимулированных макрофагов КМ с течением времени культивирования одинаков. В культуре макрофагов при 24- часовом культивировании ЯЦО имеет максимальное значение (0.59 ± 0.06 в контроле против 0.63 ± 0.04 и 0.47 ± 0.03 в присутствии 50 и 100 мкг/мл АДФН соответственно). К 48 ч культивирования за счет быстрого роста цитоплазмы макрофаги имеют минимальное значение ЯЦО (0.32 ± 0.02 в контроле против 0.31 ± 0.03 и 0.20 ± 0.02 в присутствии 50 и 100 мкг/мл АДФН соответственно). Через 72 ч ЯЦО стимулированных и нестимулированных

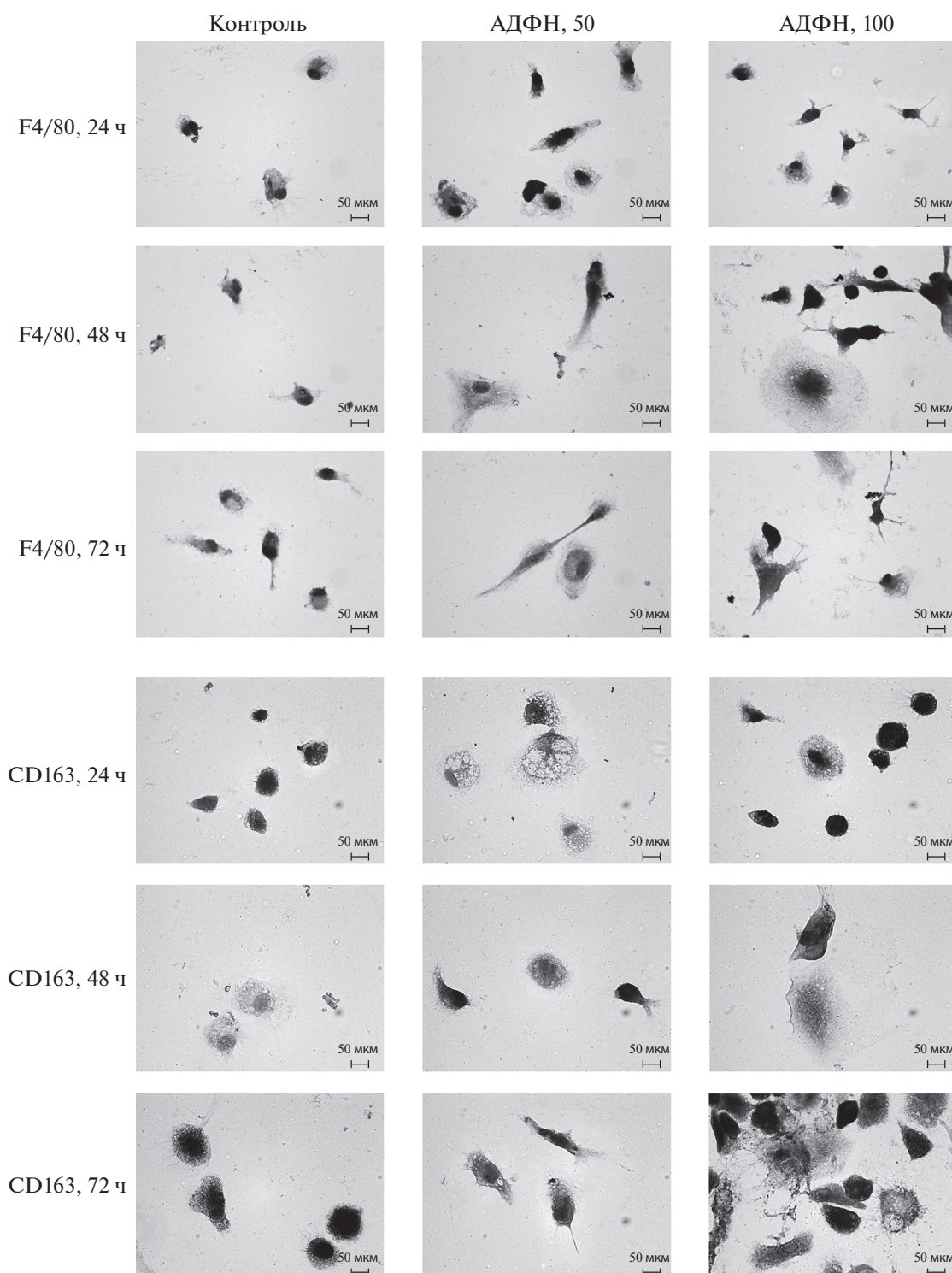


Рис. 1. Иммуноцитохимическая окраска на маркерные белки F4/80 и CD163 макрофагов костного мозга. Клетки делили на две больших группы: нестимулированные (контроль) и стимулированные макрофаги, в которые добавляли АДФН в дозе 50 мкг/мл (АДФН, 50) или 100 мкг/мл (АДФН, 100). Клетки культивировали с веществом в течение 24, 48 и 72 ч. Клетки фиксированы и подкрашены гематоксилином Эрлиха. Ув. об.: 100×.

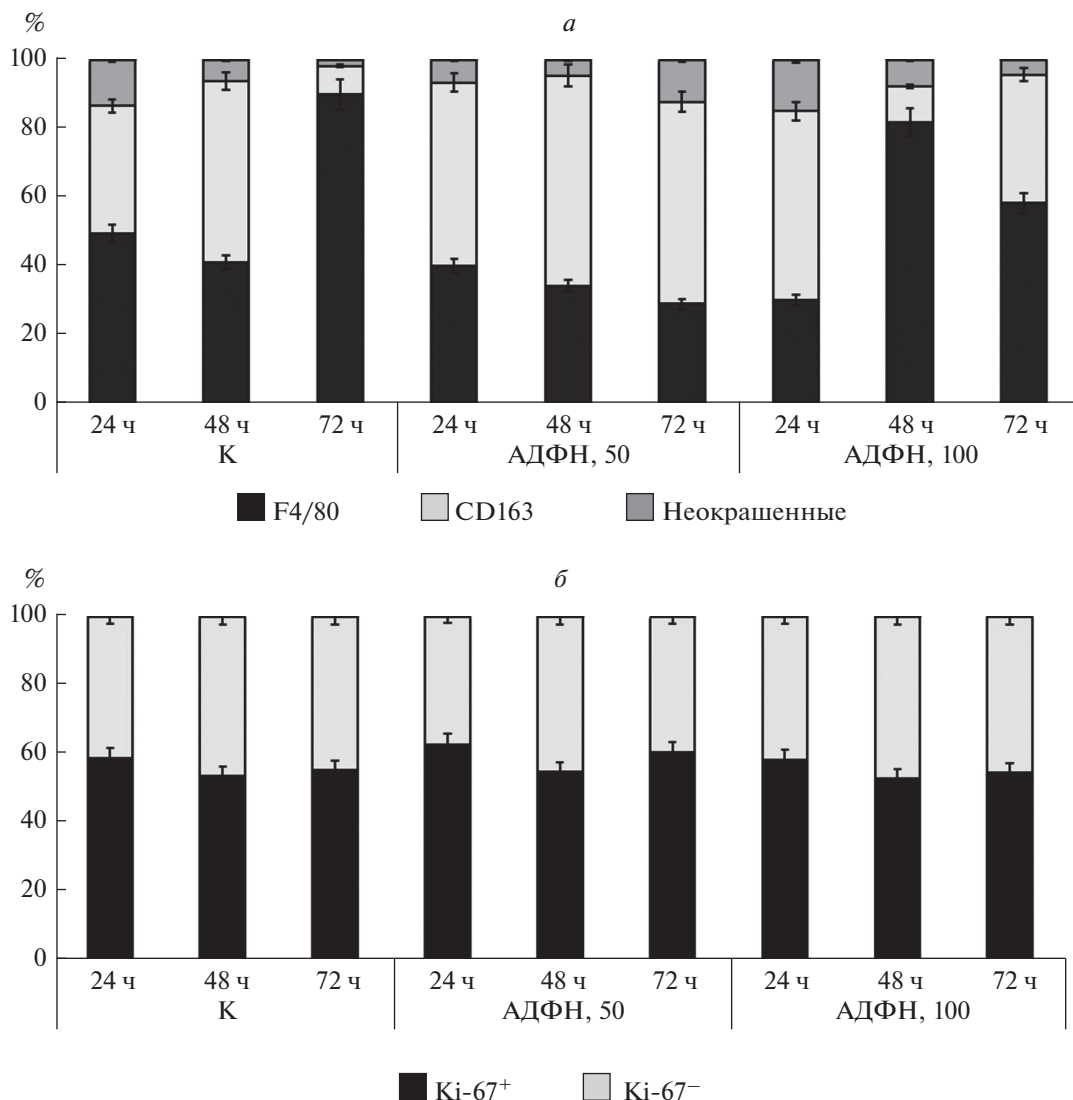


Рис. 2. Соотношение макрофагов Ki-67⁺ и Ki-67⁻ (а), а также F4/80⁺ и CD163⁺ (б) из костного мозга нестимулированных (контроль, К) и стимулированных АДФН в дозе 50 или 100 мкг/мл (АДФН, 50 и АДФН, 100 соответственно) в течение 24, 48 и 72 ч (б).

макрофагов увеличивается относительно показателя ЯЦО, измеренного через 48 ч (табл. 1).

Таким образом, для стимулированных и не стимулированных макрофагов КМ в культуре отмечается изменение морфометрических параметров с увеличением срока культивирования. При этом, в отличие от контроля, в культуре стимулированных макрофагов КМ к 48 часам культивирования в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН появляются клетки дендритоподобной формы. В сравнении с дозой АДФН 50 мкг/мл доза 100 мкг/мл при 48-часовом культивировании способствует максимальному увеличению показателей площади цитоплазмы и площади клетки макрофагов КМ в культуре.

Характеристика пролиферативной активности макрофагов КМ. Был проведен анализ соотношения макрофагов Ki-67⁺ и Ki-67⁻. Белок Ki-67 является общепринятым стандартом для оценки пролиферативной активности клеток на каждой стадии клеточного цикла, кроме клеток находящихся в G₀-фазе. В группах макрофагов, нестимулированных и стимулированных АДФН, доля Ki-67⁺-клеток преобладает на всех сроках культивирования. В период 24-часового культивирования у стимулированных и нестимулированных макрофагов наблюдается самое высокое содержание Ki-67⁺-клеток. Дальнейшее культивирование способствует незначительному уменьшению доли макрофагов Ki-67⁺ во всех исследуемых группах (рис. 2б).

Таблица 2. Содержание маркеров F4/80 и CD163 макрофагов КМ контрольных и стимулированных АДФН в дозе 50 или 100 мкг/мл в течение 24, 48 и 72 ч

Время, ч	Контроль	АДФН, 50 мкг/мл	АДФН, 100 мкг/мл
F4/80, усл. ед (M1-фенотип)			
24	129.54 ± 8.50	126.91 ± 6.58	144.17 ± 5.49 ^{a, B}
48	134.67 ± 5.10	160.33 ± 7.25 ^{a, б, в, г}	149.76 ± 3.88 ^{a, б}
72	145.95 ± 3.87 ^a	142.07 ± 5.41	134.17 ± 4.58
CD163, усл. ед. (M2-фенотип)			
24	121.71 ± 3.81	134.24 ± 2.68 ^a	132.2 ± 1.85 ^a
48	129.25 ± 2.37	119.39 ± 1.87 ^{б, B}	115.74 ± 7.26 ^{б, в, д}
72	120.74 ± 5.51	114.69 ± 2.00 ^{б, B}	129.34 ± 2.93 ^г

Примечание. Содержание маркера определяли по показателю оптической плотности иммуноцитохимической окраски. Приводятся средние значения и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^aКонтроль, 24 ч; ^бКонтроль, 48 ч; ^BАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^гАДФН, 50 мкг/мл 72 ч; ^дАДФН, 100 мкг/мл 24 ч.

Тем не менее, была отмечена следующая тенденция: при воздействии на клетки 50 мкг/мл АДФН доля Ki-67⁺-макрофагов была больше в сравнении с группами нестимулированных макрофагов и макрофагов, культивированных с АДФН в дозе 100 мкг/мл.

Фенотипическая характеристика макрофагов КМ. На рис. 2а представлено соотношение макрофагов F4/80⁺ (M1-фенотип) и CD163⁺ (M2-фенотип) контрольных и стимулированных АДФН в разные сроки культивирования. У нестимулированных макрофагов в течение 24 и 48 ч культивирования нет преобладания какого-либо определенного фенотипа макрофагов. К 72 ч наблюдается тенденция к преобладанию в культуре макрофагов F4/80⁺.

При воздействии на макрофаги 50 мкг/мл АДФН с увеличением срока культивирования происходит увеличение доли CD163⁺-клеток в культуре. АДФН в дозе 100 мкг/мл, наоборот, способствует увеличению доли F4/80⁺-макрофагов.

Содержание макрофагов F4/80⁺ и CD163⁺ оценивали по показателю оптической плотности (ОП) иммуноцитохимической реакции. У нестимулированных макрофагов с увеличением срока культивирования отмечается усиление окраски на маркер F4/80. При 48-часовом культивировании макрофагов с АДФН в дозе 50 мкг/мл окраска на маркер F4/80 наиболее интенсивна (160.33 ± 7.25 усл. ед.) в сравнении с 24 (126.91 ± 6.58 усл. ед.) и 72 (142.07 ± 5.41 усл. ед.) часами культивирования. Окрашивание на F4/80 также усиливается при воздействии на клетки 100 мкг/мл АДФН на сроках культивирования с веществом 24 и 48 ч. Содержание маркера CD163 при стимуляции

макрофагов 50 и 100 мкг/мл АДФН повышено при 24-часовом воздействии вещества на культуру (134.24 ± 2.68 и 132.2 ± 1.85 усл. ед. соответственно) по сравнению с нестимулированным контролем (121.71 ± 3.81 усл. ед.) (табл. 2).

Характеристика образования TGF-β в цитоплазме макрофагов. Клетки окрашивали иммуноцитохимически на наличие в цитоплазме TGF-β. Интенсивность окраски TGF-β у нестимулированных макрофагов уменьшается к 72 ч культивирования. Окраска на цитокин TGF-β становится более интенсивной к 48 ч культивирования клеток в присутствии 50 мкг/мл

Таблица 3. Содержание TGF-β в цитоплазме макрофагов КМ, культивированных в отсутствие (контроль) и в присутствии 50 или 100 мкг/мл АДФН в течение 24, 48 и 72 ч

Время, ч	TGF-β, усл. ед.		
	Контроль	АДФН, 50 мкг/мл	АДФН, 100 мкг/мл
24	136.06 ± 1.91	125.21 ± 1.11 ^a	141.72 ± 1.33 ^a
48	147.72 ± 1.31 ^a	152.30 ± 1.37 ^{a, б}	153.20 ± 1.55 ^{a, B}
72	113.10 ± 1.97 ^{a, б}	140.15 ± 1.47 ^б	134.02 ± 1.75 ^B

Примечание. Содержание маркера определяли по показателю оптической плотности иммуноцитохимической окраски. Приводятся средние значения и их стандартные ошибки. Отличия достоверны при $P \leq 0.05$ от группы: ^aКонтроль, 24 ч; ^бАДФН, 50 мкг/мл, 24 ч; ^BАДФН, 100 мкг/мл 24 ч.

АДФН, и ее интенсивность сохраняется в течение 72 ч. АДФН в дозе 100 мкг/мл усиливает окраску TGF- β к 48 ч, и уменьшает ее к 72 ч культивирования клеток с веществом (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Макрофаги – клетки иммунной системы, обладающие активной подвижностью, адгезивностью и выраженной способностью к фагоцитозу. В норме эти клетки отвечают за поддержание гомеостаза в различных периферических тканях (дерма, кость, легкие, селезенка, жировая ткань и пр.) путем удаления апоптических клеток и синтеза широкого спектра цитокинов. В случае возникновения патологических состояний происходит истощение макрофагов в месте локализации воспаления и восстановление пула этих клеток идет из моноцитов КМ, которые дифференцируются из кроветворной клетки-предшественника (Davies et al., 2013; Bonnarde, Williams, 2018).

В настоящее время известно, что макрофаги КМ не однородны, что выражается в большом разнообразии высвобождаемых цитокинов, маркеров клеточной поверхности и транскрипционных профилей. Также, макрофаги КМ выполняют ряд уникальных функций, связанных с процессом кроветворения: участвуют в выживании эритробластов во время их созревания, поддерживают гомеостаз гематопозитических стволовых клеток. Тканевые сигналы, сигналы нейроэндокринной системы, энергетический статус, а также сигналы, связанные с патогеном, являются потенциальными факторами, которые способны контролировать активацию макрофагов (Nagareddy et al., 2014; Röszer, 2018).

Можно предположить, как и у макрофагов любых других органов, фенотип макрофагов КМ будет меняться в зависимости от повреждающего фактора. Это может оказывать существенное влияние на интенсивность кроветворения. Участие макрофагов в восстановительном росте тканей и процессах кроветворения, делает эти клетки потенциальными мишенями для терапии при повреждении. В связи с этим, возможность репрограммирования макрофагов КМ в патогенезе заболеваний является перспективной стратегией в терапии этих заболеваний, что и определило основные цели и задачи данной работы.

В настоящей работе рассматривали ответ популяции костномозговых макрофагов в условиях *in vitro* подвергшихся стимуляции АДФН. В ряде исследований *in vivo* было показано, что соединение регулирует функционально-метаболическую активность макрофагов, ингибируя обратимо на 10–12 ч избыточную продукцию TNF- α , IL-1 и других провоспалительных факторов, а также повышая продукцию TGF- β и IL-10 при регенерации поврежденных ор-

ганов (Jukić et al., 2011, 2012; Danilova et al., 2017, 2020; Поздина и др., 2020).

В отличие от зрелых тканевых макрофагов, выделенных из других органов, в культуре макрофагов КМ экспрессия маркеров F4/80 и CD163 и также окончательная дифференциация клеток происходит к 48 ч культивирования (Поздина и др., 2020). В процессе роста у нестимулированных макрофагов нет преобладания какого-либо определенного фенотипа. Через 72 ч культивирования макрофаги КМ в большинстве своем становятся преимущественно провоспалительными (M1). Это означает, что для незрелых макрофагов КМ не характерно преобладание какого-либо одного фенотипа, а зрелые макрофаги КМ в подавляющем большинстве являются провоспалительными (M1) клетками, функцией которых является фагоцитирование клеточного дебриса и участие в клеточном ответе на воспалительные реакции организма. С увеличением срока культивирования у нестимулированных макрофагов отмечается понижение содержания TGF- β .

АДФН обладает выраженным дозозависимым действием на макрофаги КМ. Стимуляция макрофагов АДФН в дозе 50 мкг/мл способствует росту количества CD163⁺-клеток и содержания этого маркера с увеличением срока культивирования. Действие 100 мкг/мл АДФН, наоборот, с увеличением времени культивирования приводит к повышению доли F4/80⁺-клеток в культуре и росту содержания этого маркера. При воздействии АДФН (50 и 100 мкг/мл) содержание TGF- β достигает максимального значения к 48 ч культивирования клеток с веществом. При добавлении АДФН в культуру моноцитов ускоряется созревание макрофагов.

Ранее было показано, что АДФН в резидентных макрофагах способствует изменению профиля секретируемых цитокинов, при этом изменения количества поверхностных фенотипических маркеров не происходило (Поздина и др., 2020). В отличие от резидентных макрофагов, макрофаги КМ обладают более выраженным ответом на вещество, который приводит к поляризации макрофагов и появлению фенотипа M1 или M2. Однако имеющихся данных недостаточно. В следующей работе мы планируем оценить секрецию цитокинов для однозначного утвердительного ответа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной программы “Изучение механизмов регенераторных процессов в органах и тканях с использованием экспериментальных моделей экстремальных факторов и токсического воздействия на организм” (Гос. регистрация № АААА-А18-118020590107-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№ d-ТМ-2016-20) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Данилова И.Г., Емельянов В.В., Гетте И.Ф., Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Черешнева М.В., Сидорова Л.П., Черешнев В.А., Соколова К.В. 2018. Цитокиновая регуляция регенераторных процессов в поджелудочной железе при аллоксановом сахарном диабете у крыс и его коррекция соединением ряда 1,3,4-тиадиазина и липоевой кислотой. Мед. Иммунол. Т. 20. № 1. С. 35. (Danilova I.G., Emelianov V.V., Gette I.F., Medvedeva S.Yu., Bulavintseva T.S., Cheresheva M.V., Sidorova L.P., Chereshev V.A., Sokolova K.V. 2018. Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-induced diabetic rats, and its correction by 1,3,4-thiadiazine composition and lipoic acid. Med. Immunol. (Russia). V. 20. № 1. P. 35.)
- Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т. 2020а. Иммунофенотипические особенности альвеолярных макрофагов и макрофагов селезенки животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*. Рос. иммунол. журн. Т. 23. № 2. С. 145. (Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T. 2020a. Immunophenotypical aspects of lung and spleen macrophages derived animals with the model of alloxan diabetes (type I) and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione *in vitro*. Russian J. Immunology. V. 23. № 2. P. 145.)
- Поздина В.А., Данилова И.Г., Абидов М.Т. 2020б. Иммунофенотипические особенности макрофагов печени и перитонеальной области животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*. Цитология. Т. 62. № 8. С. 581. (Pozdina V.A., Danilova I.G., Abidov M.T. 2020b. Immunophenotypical aspects of peritoneal and liver macrophages derived animals with the model of alloxan diabetes (type I) and their correction by sodium aminodiglydrophthalazindione *in vitro*. Tsitologiya. V. 62. № 8. P. 581.)
- Сарбаева Н.Н., Пономарева Ю.В., Мильякова М.Н. 2016. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами. Гены и клетки. Т. 11. № 1. С. 9. (Sarbaeva N.N., Ponomareva J.V., Milyakova M.N. 2016. Macrophages: diversity of phenotypes and functions, interaction with foreign materials. Genes & Cells. V. 11. № 1. P. 9.)
- Сумина В.П., Гагиева А.В., Диденко М.И. 2016. Репрограммирование клеточных ответов макрофагов: возможности управления воспалительным процессом. Журн. науч. ст. "Здор. и обр. в 21 веке" Т. 18. № 3. С. 92. (Sumina V.P., Gagieva A.V., Didenko M.I. 2016. A review of the control of the immune response: reprogramming of macrophages as a promising direction of pathophysiology. The Jour. of sci. artc. "Health and Educ. Mil.". 2016. V. 18. № 3. P. 92.)
- Шарафутдинова Л.А., Горшкова Е.Н., Садртдинова И.И., Хисматуллина З.Р., Башкатов С.А. 2014. Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. Биомедицина. № 3. С. 49. (Sharafutdinova E.N., Gorshkova I.I., Sadrtinova Z.R., Khismatulina S.A. 2014. Evaluation of the morphological parameters of neutrophilic granulocytes by atomic force microscopy after exposure to fullerene C60. Biomed. (Russ.) V. 3. P. 49–53.)
- Blériot C., Dupuis T., Jouvion G., Eberl G., Disson O., Lecuit M. 2015. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. Immunity. V. 42. № 1. P. 145.
- Bonnardel J., Williams M. 2018. Developmental control of macrophage function. Curr. Opin. Immunol. V. 50. P. 64.
- Chang M.K., Raggatt L.-J., Alexander K.A., Kuliwaba J.S., Fazlali N.L., Schroder K., Maylin E.R., Ripoll V.M., Hume D.A., Pettit A.R. 2008. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol. V. 181. P. 1232.
- Cho Sun Wook, Soki Fabiana N., Koh Amy J., Eber Matthew R., Entezami Payam, Park Serk In, van Rooijen Nico, McCauley Laurie K. 2014. Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. PNAS. V. 111. P. 1545.
- Chow A., Lucas D., Hidalgo A., Méndez-Ferrer S., Hashimoto D., Scheiermann C., Battista M., Leboeuf M., Prophete C., Van Rooijen N., Tanaka M., Merad M., Frenette P.S. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. J. Exp. Med. V. 208. P. 261.
- Christopher M.J., Rao M., Liu F., Woloszynek J.R., Link D.C. 2011. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. J. Exp. Med. V. 208 P. 251.
- Danilova I.G., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y. 2017. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. Biomed. Pharmacother. V. 95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.117>
- Danilova I.G., Shafigullina Z.A., Gette I.F., Sencov V.G., Medvedeva S.Y., Abidov M.T. 2020. Accelerated liver recovery after acute CCl4 poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide. Int. Immunopharmacol. V. 80. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106124>
- Davies L.C., Rosas M., Jenkins S.J., Liao C.T., Scurr M.J., Brombacher F., Fraser D.J., Allen J.E., Jones S.A., Taylor P.R. 2013. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat. Commun. V. 4. P. 1886.
- Dutta P., Hoyer F.F., Grigoryeva L.S., Sager H.B., Leuschner F., Courties G., Borodovsky A., Novobrantseva T., Ruda V.M., Fitzgerald K., Iwamoto Y., Wojtkiewicz G., Sun Y., Da Silva N., Libby P. et al. 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. J. Exp. Med. V. 212. P. 497.

- Hur J., Choi J.I., Lee H., Nham P., Kim T.W., Chae C.W., Yun J.Y., Kang J.A., Kang J.H., Lee S.E., Yoon C.H., Boo K.J., Ham S.J., Roh T.Y., Jun J.K. et al. 2016. CD82/KAI1 maintains the dormancy of long-term hematopoietic stem cells through interaction with DARC-expressing macrophages. *Cell Stem Cell*. V. 18. P. 508.
- Jacobsen R.N., Forristal C.E., Raggatt L.J., Nowlan B., Barbier V., Kaur S., Van Rooijen N., Winkler I.G., Pettit A.R., Levesque J.P. 2014. Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullary erythropoiesis by depleting F4/80(+)VCAM1(+)CD169(+)ER-HR3(+)Ly6G(+)erythroid island macrophages in the mouse. *Exp. Hematol*. V. 42. P. 547.
- Jukić T., Abidov M., Ihan A. 2011. A tetrahydrophthalazine derivative 'sodium nucleinate' exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells in vitro and in vivo. *Collegium Antropol.* V. 35. P. 1219.
- Jukić T., Ihan A., Jukić D. 2012. Tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exerts its anti-inflammatory effects through inhibition of oxidative burst in human monocytes. *Collegium Antropol.* V. 36. P. 409.
- Kawane K., Fukuyama H., Kondoh G., Takeda J., Ohsawa Y., Uchiyama Y., Nagata S. 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*. V. 292. P. 1546–1549.
- Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. V. 409. P. 198.
- Li J.Y., Chassaing B., Tyagi A.M., Vaccaro C., Luo T., Adams J. 2016. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J. Clin. Invest.* V. 126. P. 2049–2063.
- Liu M., Jin X., He X., Pan L., Zhang X., Zhao Y. 2015. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One*. V. 10. e0121921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121921>
- Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. 2014. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. V. 1. P. 1.
- Nagareddy P.R., Kraakman M., Masters S.L., Stirzaker R.A., Gorman D.J., Grant R.W., Dragoljevic D., Hong E.S., Abdel-Latif A., Smyth S.S., Choi S.H., Korner J., Bornfeldt K.E., Fisher E.A., Dixit V.D. et al. 2014. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab*. V. 19. P. 821.
- Osterud B., Bjorklid E. 2003. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol. Rev.* V. 83. P. 1069.
- Pettit A.R., Chang M.K., Hume D.A., Raggatt L.J. 2008. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. V. 43. P. 976.
- Röszer T. 2018. Understanding the biology of self-renewing macrophages. *Cells*. V. 7. P. 103.
- Schaer D.J., Schaer C.A., Buehler P.W., Boykins R.A., Schoedon G., Alayash A.I., Schaffner A. 2006. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*. V. 107. P. 373.
- Sinder B.P., Pettit A.R., McCauley L.K. 2015. Macrophages: their emerging roles in bone. *J. Bone Miner. Res.* V. 30. P. 2140.
- Sonoda Y., Sasaki K. 2008. Surface morphology of the central macrophages of erythroblastic islets in the spleen of aged and pregnant mice: an immunohistochemical light microscopic study. *Arch. Histol. Cytol.* V. 71. P. 155.
- Toda S., Segawa K., Nagata S. 2014. MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood*. V. 123. P. 3963.
- Tonkin J., Temmerman L., Sampson R.D., Gallego-Colon E., Barberi L., Bilbao D., Schneider M.D., Musaro A., Rosenthal N. 2015. Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Mol. Ther.* V. 23. P. 1189.
- Ulyanova T., Jiang Y., Padilla S., Nakamoto B., Papayannopoulou T. 2011. Combinatorial and distinct roles of alpha(5) and alpha(4) integrins in stress erythropoiesis in mice. *Blood*. V. 117. P. 975.
- Winkler I.G., Sims N.A., Pettit A.R., Barbier V., Nowlan B., Helwani F., Poulton I.J., Van Rooijen N., Alexander K.A., Raggatt L.J., Levesque J.P. et al. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC. *Blood*. V. 116. I. 23. P. 4815.
- Wu A.C., Raggatt L.J., Alexander K.A., Pettit A.R. 2013. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Bonekey Rep.* V. 2. P. 373.
- Wu A.C., He Y., Broomfield A., Paatan N.J., Harrington B.S., Tseng H.W., Beaven E.A., Kiernan D.M., Swindle P., Clubb A.B., Levesque J.P., Winkler I.G., Ling M.T., Srinivasan B., Hooper J.D. et al. 2016. CD169(+) macrophages mediate pathological formation of woven bone in skeletal lesions of prostate cancer. *J. Pathol.* V. 239. P. 218.

Immunophenotypic and Morphometric Evaluation of Bone Marrow Macrophages Culture Stimulated with Sodium Aminodihydrophthalazinedione *In Vitro*

V. A. Pozdina^{a,*}, U. V. Zvedenina^b, M. V. Ulitko^{c,d}, I. G. Danilova^{a,d}, and M. T. Abidov^e

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620049 Russia

^b Ural State Medical University, Yekaterinburg, 620028 Russia

^c Institute of Natural Sciences and Mathematics, Ural Federal University, Yekaterinburg, 620026 Russia

^d Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, 620026 Russia

^e Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, 1000 Slovenia

*e-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Morphometrical and immunophenotypical characteristics of macrophage cell cultures obtained from rats bone marrow were evaluated. Obtained cell cultures were stimulated with macrophages activator aminodihydrophthalazine-

dione (ADPN) *in vitro* for 24, 48 and 72-hour. Cells, nucleus, cytoplasm area were measured and nuclear cytoplasmic ratio (NCR) were calculated. Proliferative activity was assessed by the presence of the Ki-67 protein. The phenotype of macrophages was determined by the expression of the CD163 and F4/80 receptors. The content of the growth factor TGF- β in the cytoplasm of macrophages was estimated. Stimulation of macrophages by 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN promoted an increase in the number of CD163⁺ cells and content of this marker with an increase of cultivation time. On the contrary, the action of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN leads to an increase in the proportion of F4/80⁺ cells in the culture and to an increase of the marker content with an increase of cultivation time. The accumulation of TGF- β occurs during 48 h of cell cultivation under the action of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN. Increased amounts of the factor persist for 72 hours. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADPN enhanced the formation of TGF- β within 48 h, and inhibited it in 72 h in the presence of the substance. When ADPN is added to the culture of monocytes, the maturation of macrophages is accelerated. Moreover, the substance also has a pronounced dose-dependent effect on bone marrow macrophages.

Keywords: macrophages, bone marrow, sodium aminodihydrophthalazinedione