

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА НЕЗАВИСИМОЙ ОТ ЛИМФОЦИТОВ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ В КИШЕЧНИКЕ МЫШЕЙ

© 2019 г. Е. А. Литвинова<sup>1,2\*</sup>, К. М. Ачасова<sup>2,1</sup>

\*E-mail: dimkit@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН»,  
Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии  
и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Острый воспалительный процесс начинается с классического пути активации макрофагов. При хронической форме заболевания организм запускает адаптивный альтернативный путь активации М2-макрофагов. Например, при воспалительном заболевании кишечника (ВЗК) в хронической форме увеличивается количество М2-макрофагов в тканях кишечника. Мы создали модель мышей, у которых отсутствуют зрелые лимфоциты и эти животные склонны к развитию ВЗК из-за отсутствия мукозального барьера в кишке. В результате мы получили хорошую модель, которая раскрывает роль макрофагов и лимфоцитов в развитии ВЗК, а также может быть использована для понимания действия фармакологических препаратов, вызывающих поляризацию макрофагов.

**Ключевые слова:** макрофаг, лимфоцит, мукозальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210006651-1

**Адрес:** 633501, Новосибирская область, п. Краснообск, ул. Центральная, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН» (СФНЦА РАН), лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, Литвинова Екатерина Анатольевна. Тел. 8 923 147 94 64 (моб.)

**E-mail:** dimkit@mail.ru

**Авторы:**

**Литвинова Е. А.**, с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; в.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия;

**Ачасова К. М.**, аспирант лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; м.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия.

Как бактериальные, так и неинфекционные заболевания начинаются с активации врожденного иммунитета, при котором происходит наработка провоспалительных цитокинов и ак-

тивация макрофагов по классическому пути – М1-тип. Они нарабатывают активные формы кислорода, включая NO, которые способствуют элиминации инфекции и поврежденных/зараженных клеток. Однако длительное воздействие М1-типа макрофагов может быть губительными для клеток хозяина. Поэтому происходит адаптация организма, которая переключает иммунитет на альтернативный путь. Макрофаги, поляризованные по М2 пути, обеспечивают наработку антител, регенерацию тканей и снижают количество воспалительных факторов [1]. Такие формы адаптации иммунитета встречаются как правило при хронических заболеваниях. В последние годы очень актуален поиск веществ способных переключать поляризацию макрофагов с одного на другой тип в качестве терапии различных заболеваний [2]. Из механизма пока известно, что процесс сопряжен с активацией разных типов Т-хелперных лимфоцитов [1]. Происходит ли раньше активация лимфоцитов или поляризация макрофагов пока не известно, так же как до сих пор не понятно могут ли эти процессы быть независимыми. Опубликовано лишь немного

исследований, в которых на конкретных моделях заболеваний показано, что поляризация макрофагов не зависит от лимфоцитов [3].

Экспериментальная модель воспалительного заболевания кишечника (ВЗК) — мыши с нулевой мутацией гена *Muc2*, основного протеогликана вовлеченного в барьерный иммунитет. На ней мы определили, что уже в возрасте 2-х недель наблюдается поляризация макрофагов по М2 типу (хроническая форма ВЗК). Чтобы понять происходит ли такая поляризация за счет включения Т-хелперных лимфоцитов 2-го типа или независимо мы создали модель, у которой помимо отсутствия гена *Muc2* есть однонуклеотидная мутация SCID в гене *Prkdc*. Отсутствие каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы препятствует созреванию лимфоцитов, в связи с этим у мышей нет зрелых лимфоцитов. Это удобная модель для изучения роли лимфоцитов в различных патологических процессах. В настоящее время до сих пор не изучен вклад лимфоцитов в развитие хронической формы ВЗК у мышей с нарушенной барьерной функцией.

**Целью** нашей работы было определить роль лимфоцитов в поляризации макрофагов при развитии хронической формы ВЗК у таких мышей.

В данной работе путем скрещивания мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*<sup>-/-</sup>) и *Prkdc*<sup>SCID</sup> были получены нужные генотипы, включая нашу экспериментальную модель. В рамках выполнения генотипирования мы усовершенствовали ранее опубликованный метод идентификации мутации SCID с помощью анализа ПЦР в реальном времени. В возрасте 14, 21, 28 дней полученных животных четырех генотипов: *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup>, *Muc2*<sup>-/-</sup>, *Prkdc*<sup>SCID</sup> и WT (дикий тип), — сравнили по уровню экспрессии генов *Arg1* (М2-тип) и *Nos2* (М1-тип), гиперплазии крипт нисходящего отдела толстой кишки и количеству макрофагов. Исследование выполнено в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. В исследовании использовали мышей свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA 2014). На гистологических срезах не было выявлено признаков острого воспаления, таких как отек и эрозия эпителия в нисходящем отделе толстой кишки у мышей всех четырех генотипов. Однако, у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup> была отмечена гиперплазия крипт и больше макрофагов, чем у *Prkdc*<sup>SCID</sup> и WT только в возрасте 28 дней. Подобные признаки хронического протекания заболевания ВЗК были

показаны на других экспериментальных моделях животных, а также у пациентов с ВЗК.

Известно, что на начальной стадии любого воспаления повышается уровень индуцированной NO-синтетазы (*Nos2*), который неизбежно влечет повышение свободных радикалов. И действительно, количество mRNA генов *Nos2* увеличивалось у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup> уже в 14 дней. В другие возрастные периоды экспрессия *Nos2* повышалась только у *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup>, тогда как у *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей активность этого гена снижалась до уровня контрольных генотипов *Prkdc*<sup>SCID</sup> и WT. Отсутствие снижения уровня экспрессии *Nos2* может быть губительным для организма. И, действительно, такие животные уже на стадии 2 месяцев демонстрировали клинические признаки колита, такие как пролапс и довольно раннюю смертность, по сравнению с *Muc2*<sup>-/-</sup> мышами. Таким образом, можно предположить, что наличие лимфоцитов у *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей подавляют активность и поляризацию макрофагов по М1 типу, вызванную недостатком барьерного иммунитета. Такое снижение активности М1 макрофагов благоприятно сказывается на состоянии организма.

На стадии хронического воспаления происходит поляризация макрофагов с М1 на М2 тип. Макрофаги М2 типа активно синтезируют аргиназу 1, которая катализирует распад L-аргинина до орнитина и мочевины. В свою очередь орнитин дальше метаболизируется в полиамины, которые запускают процесс деления клеток и репарацию. У мышей с нарушенной барьерной функцией *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup> в возрасте 14 дней повышается экспрессия гена *Arg1*. Но наиболее значимое увеличение количества мРНК происходит только к 28-ми дням у этих генотипов. Значительный подъем макрофагального метаболита сопряжен с увеличением количества клеток в крипте к этому возрасту, что может быть причиной повышения концентрации полиаминов в ткани толстой кишки. Так как увеличение экспрессии маркера макрофагов М2-типа происходит одинаково у мышей двух генотипов *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-Prkdc</sup><sup>SCID</sup>, то можно предположить, что оно не зависит от наличия зрелых лимфоцитов.

Полученная нами модель животных с нарушенной барьерной функцией и отсутствием зрелых лимфоцитов может быть хорошим объектом для изучения эффекта фармакологических препаратов участвующих в реполяризации макрофагов или в снижении их активности без участия зрелых лимфоцитов. Это позволит де-

тально понять механизм действия таких препаратов.

Исследование поддержано бюджетным проектом № 0533-2019-0003. Приобретение реактивов осуществлено за счет гранта РФФИ 18-015-00329.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Martinez F. O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. // F1000Prime Rep.— 2014.—V.6.—P. 13. doi:10.12703/P6-13.
2. *Goswami K. K., Sarkar M., Ghosh S., Saha A., Ghosh T., Guha I., Barik S., Banerjee S., Roy S., Bose A., Dasgupta P., Baral R.* Neem leaf glycoprotein regulates function of tumor associated M2 macrophages in hypoxic tumor core: Critical role of IL-10/STAT3 signaling. // *Molecular Immunology*.—2016.—V.80.—P. 1–10. doi: 10.1016/j.molimm.2016.10.008.
3. *Mills C. D., Ley K. J.* M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. // *Innate Immun.*— 2014.—V6(6).—P. 716–726. doi: 10.1159/000364945.

### EXPERIMENTAL MODEL FOR THE STUDY OF A INDEPENDENT FROM THE LYMPHOCYTES OF POLARIZATION INTESTINAL MACROPHAGES IN THE MICE

© 2019 E. A. Litvinova<sup>1,2</sup>, K. M. Achasova<sup>2,1</sup>

\*E-mail: dimkit@mail.ru

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Acute inflammatory begins to activate of M1-macrophage by classical pathway. In the chronic form of the disease, the body triggers an adaptive alternative pathway to activate of M2-macrophages. For example, the number of intestinal M2-macrophages increases in inflammatory bowel disease (IBD) of a chronic form. We have got a model of mice that do not have mature lymphocytes and these animals development of IBD due to the absence of a intestinal mucosal barrier. We obtained a good model that reveals the role of macrophages and lymphocytes in the development of IBD, and can also be used to understand the effect of pharmacological drugs that cause polarization of macrophages.

*Key words:* macrophage, lymphocyte, mucosal immunity

#### Authors:

**Litvinova E. A.**, ✉ leading researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk; senior researcher in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** dimkit@mail.ru;  
**Achasova K. M.**, PhD student in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SBRAS, Novosibirsk; junior researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk, Russia.