

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА И ИХ КОРРЕКЦИЯ АМИНОДИГИДРОФТАЛАЗИНДИОНОМ НАТРИЯ *IN VITRO*

Поздина В.А.^{1,2}, Данилова И.Г.¹, Абидов М.Т.³

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

² Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

³ Институт иммунологии и профилактической медицины, г. Любляна, Словения

Резюме. Макрофаги обнаруживаются во всех тканях и органах и обладают функциональной пластичностью, которая необходима для поддержания гомеостаза, регенерации тканей и иммунитета. Фенотип макрофагов определяется сигналами микроокружения. Традиционно выделяют классически (M1) или альтернативно (M2) активированные макрофаги. В патогенезе сахарного диабета (СД1) M1-макрофаги способствуют повреждению островков Лангерганса, потере β-клеток, вызывая аутофагию, которая может привести к развитию персистирующей инфекции. Развитие инфекции увеличивает риск смерти от гриппа или пневмонии у больных СД1. Поэтому представляется интересным изучение функционального ответа резидентных макрофагов органов и тканей, не являющихся мишенями при развитии сахарного диабета, а также их ответ на стимуляцию АДФН, который в ряде работ показывал модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки.

В работе были исследованы морфологические и функциональные характеристики культуры макрофагов различной тканевой принадлежности, выделенные у интактных животных (ИЖ) и животных с моделью сахарного диабета 1 типа (СД1) в условиях стимуляции их веществом-модулятором макрофагов аминодигидрофталазиндионом натрия (АДФН) *in vitro* в условиях 24- и 72-часового культивирования. Исследование проводили на культурах макрофагов крысы, полученных из легких и селезенки. Определяли следующие морфометрические показатели: площадь клетки, цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Фенотип макрофагов определяли по оптической плотности экспрессии маркера CD163 (макрофагов типа M2) и CD80 (макрофаги M1).

Адрес для переписки:

Поздина Варвара Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Address for correspondence:

Pozdina Varvara A.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: varvara.pozdina@gmail.com

Образец цитирования:

В.А. Поздина, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов
«Имунофенотипические особенности альвеолярных
макрофагов и макрофагов селезенки животных с
моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция
аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro*»
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,
№ 2. С. 145-152.
doi: 10.46235/1028-7221-350-IAO

© Поздина В.А. и соавт., 2020

For citation:

V.A. Pozdina, I.G. Danilova, M.T. Abidov
“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 Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 145-152.
doi: 10.46235/1028-7221-350-IAO

DOI: 10.46235/1028-7221-350-IAO

Функциональную активность макрофагов оценивали по уровню цитокинов IL-1 α , IL-10 и TNF α в супернатантах культур. Воздействие АДФН на макрофаги животных с СД1 через 24 ч культивирования также приводило к изменению морфометрических параметров (уменьшению размеров ядра и клетки макрофагов селезенки, увеличению размеров ядра альвеолярных макрофагов, росту ЯЦО у макрофагов селезенки) и синтетической активности клеток (повышению уровня IL-1 α и TNF α практически во всех популяциях клеток). Через 72 ч культивирования уровни секреции IL-1 α и TNF α снижались у альвеолярных макрофагов, у макрофагов селезенки уровень секреции TNF α снижался, а IL-1 α увеличивался. Экспрессия поверхностноклеточных маркеров M1- и M2-фенотипов также была подвержена действию АДФН. В особенности было отмечено увеличение экспрессии CD163 у стимулированных альвеолярных макрофагов, выделенных из животных с СД1.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, макрофаги селезенки, аминоксидигидрофтализиндион натрия

IMMUNOPHENOTYPICAL ASPECTS OF LUNG AND SPLEEN MACROPHAGES DERIVED ANIMALS WITH THE MODEL OF ALLOXAN DIABETES (TYPE I) AND THEIR CORRECTION BY SODIUM AMINODIGYDROPH TALAZINDIONE *IN VITRO*

Pozdina V.A.^{a, b}, Danilova I.G.^a, Abidov M.T.^c

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Branch of National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

Abstract. Macrophages are found in all tissues and organs and display functional plasticity, which is necessary to maintain homeostasis, tissue regeneration and immunity. The macrophage phenotype is determined by microenvironment signals. Macrophages are traditionally classified into subsets- such as classically (M1) or alternatively (M2) activated macrophages. In the pathogenesis of diabetes mellitus (T1DM), M1 macrophages contribute to damage to the islets of Langerhans, loss of β -cells, causing autophagy, which can result in development of persistent infection increasing the risk of death from influenza or pneumonia in patients with type 1 diabetes. Therefore, it seems Important to study functional response of resident macrophages in organs and tissues not targeted in development of diabetes mellitus, as well as in response to ADPH stimulation that showed modulatory effect on immunocompetent cells.

In this study morphological and functional characteristics of macrophage cell cultures obtained from different sites in intact animal (IA) and modeled type 1 diabetes mellitus (DM1) were investigated. For this, we examined macrophage cell cultures isolated from rat liver and peritoneal cavity to be stimulated *in vitro* for 24 and 72 hours with a sodium aminodigydroph talazindione. Cells, nucleus, cytoplasm area were measured and nuclear cytoplasmic ratio (NCR) were calculated. The phenotype was determined by surface expression of CD163 (M2-macrophages) and CD80 (M1-macrophages) receptors. Macrophage cytokine activity was determined by measuring IL-1 α , IL-10 и TNF α level. ADPH effects on animal macrophages with DM1 after 24 h of exposure also led to a changed morphometric parameters (decreased size of the nucleus and cells of the spleen macrophages, increased size of the nucleus of the alveolar macrophages, increased NCR in spleen macrophages) and production activity of the cells (increased levels of IL-1 α and TNF α in almost all cell populations). After 72 h of cultivation, the levels of IL-1 α and TNF α decreased in alveolar macrophages, splenic macrophages, whereas TNF α level was decreased, but IL-1 α amount was increased. The expression of surface cell markers for M1 and M2 phenotypes was also affected by ADPH so that CD163 expression was increased in stimulated alveolar macrophages isolated from animals with type 1 diabetes.

Keywords: alveolar macrophages, spleen macrophages, sodium aminodigydroph talazindione

Принятые сокращения: АДФН – аминоксидогидрофталазиндион натрия; АМф – альвеолярные макрофаги; МфС – макрофаги селезенки; СД1 – сахарный диабет 1 типа; ППС – полная питательная среда; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение; FBS – фетальная бычья сыворотка.

Введение

Макрофаги образуют систему фагоцитирующих мононуклеаров, представленную во всех тканях и органах и обладающую функциональной пластичностью, которая необходима для поддержания гомеостаза и регенерации тканей и иммунитета против патогенных микроорганизмов [8]. Фенотип макрофагов определяется сигналами, которые они получают из широко изменяющегося микроокружения. Традиционно выделяют классически (M1) или альтернативно (M2) активированные макрофаги [5]. Макрофаги типа M1 демонстрируют повышенную фагоцитарную активность, экспрессируют провоспалительные маркеры и секретируют цитокины, в частности такие, как CD80, CD86, TNF α и IL-1 α . Макрофаги типа M2 выполняют противоположные функции, экспрессируя противовоспалительные маркеры (CD163, CD206) и секретируя цитокины (IL-10), факторы ангиогенеза и фиброгенеза (TGF- β), а также стимулируют прекращение воспалительной реакции, служат заживлению раны и участвуют в поддержании тканевого гомеостаза [6, 7, 10].

Гибель β -клеток поджелудочной железы, приводящая к гипoinsулинемии, является причиной, вызывающей развитие СД1 и его многочисленных осложнений. В патогенезе СД1 макрофаги с фенотипом M1 играют существенную роль, так как они способствуют повреждению островков Лангерганса и потере β -клеток, вызывая аутофагию, которая может привести к развитию персистирующей инфекции. Инфекция вызывает особую обеспокоенность у пациентов с СД1, так как на фоне хронического воспалительного заболевания возрастает риск смерти от гриппа или пневмонии, поскольку пациенты с СД1 более подвержены вторичным инфекциям [12].

В наших предыдущих исследованиях в модели аллоксанового диабета (СД1) было показано, что использование модулятора макрофагов аминоксидогидрофталазиндиона натрия (АДФН) способствует пролиферации β -клеток островков Лангерганса, снижению уровня глюкозы, гликированного гемоглобина, увеличению содержания инсулина в крови [3]. Признание роли макрофагов в регенерации β -клеток дает возможность для углубления нашего понимания того, как макро-

фаги могут влиять на гомеостаз других органов и тканей, не являющихся мишенями при развитии сахарного диабета.

В связи с вышеизложенным в работе была поставлена задача подробно изучить особенности функционирования различных популяций резидентных макрофагов, выделенных из органов, не являющихся мишенями СД1, животных с моделью СД1. Кроме того, в условиях *in vitro* оценивали клеточный ответ и изменение морфофункциональных параметров макрофагов, подвергшихся стимуляции АДФН, который в ряде работ показывал модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки [2, 3].

Материалы и методы

В работе использовали 20 самцов крыс Wistar в возрасте 3 месяцев и весом $210 \pm 5,16$ г. Животных, из которых получали макрофаги, делили на две группы по 10 голов: интактные животные (ИЖ) и животные с моделью СД1 (СД1). Для моделирования производили внутрибрюшинное введение аллоксана, разведенного в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 300 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [1]. Через 30 суток после первого введения аллоксана развивался СД1, для верификации которого в плазме крови крыс определяли концентрацию глюкозы ($19,78 \pm 4,8$ ммоль/л), а в цельной крови – гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) ($6,3 \pm 0,52\%$). Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (№-d-ГМ-2016-20) и выполнены в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС.

Альвеолярные макрофаги (АМф) получали из бронхоальвеолярной жидкости методом альвеолярного лаважа теплым раствором Хэнкса в объеме 3–4 мл [12]. Получение макрофагов селезенки (МфС) производили путем фрагментирования с помощью ножниц извлеченной селезенки с небольшим количеством (5 мл) раствора Хэнкса [9]. Полученные суспензии клеток центрифугировали на холоде 5 минут при 1500 g. Клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и добавляли по 2 мл в 6-луночные планшеты с покровными стеклами. Для культивирования клеток использовали культуральную среду RPMI-1640 («Биолот», Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки FBS («Биолот», Санкт-Петербург) (10% от общего объема среды), а также антибиотик гентамицин в концентрации 40 мкг/мл. Выделение макрофагов основывалось на особенностях их адгезивности (разделение на прилипающую и неприлипающую

щую фракции) [9]. Через 1 час культивирования клеточной суспензии в полной питательной среде 6-луночные планшеты промывали раствором Хэнкса. Затем в очищенную культуру макрофагов добавляли свежую ППС и культивировали в течение 24 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Через 24 часа культивирования в полученные культуры макрофагов добавляли АДФН (натриевую соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона) в дозе 10 мкг/мл на 24 и 72 ч. По истечении сроков культивирования в присутствии АДФН супернатант клеток сливали и замораживали для иммуоферментного анализа, покровные стекла с клетками в планшетах фиксировали 10%-ным раствором формалина в течение 5 минут.

В качестве морфометрических показателей определяли площадь клетки, цитоплазмы и ядра, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Для определения фенотипа макрофагов клетки окрашивали иммуноцитохимически на поверхностные маркеры CD80 (MA5-16510) и CD163 (MA5-16658, ThermoFisher, США). Степень экспрессии CD80⁺ и CD163⁺ макрофагов оценивали по оптической плотности окраски. Обработку изображений производили на базе УНИИФ – филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России с помощью оптического микроскопа Carl Zeiss Axio Observer D1 (Zeiss, Германия), подключенной к нему камеры AxioCam 512 (Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 (Zeiss, Германия).

ТАБЛИЦА 1. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ (АМф) И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИЕ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ

TABLE 1. MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM_φ) AND SPLEEN (SM_φ) MACROPHAGES ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10 μg/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS

Мф и жив-е Mφ and An-s	Время, час Time, hour	Площадь ядра, мкм ² Nucleus area, mkm ²		Площадь клетки, мкм ² Cell area, mkm ²		ЯЦО NCR	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AMφ, IA	24	159,65±20,60	97,04±21,96 ^a	926,04±32,92	522,27±152,74 ^a	0,33±0,07	0,43±0,20
	72	160,25±15,55 ^a	177,44±10,72 ^{a, b}	534,767±135,270 ^a	674,92±104,35 ^{a, b}	0,69±0,06 ^a	0,71±0,13 ^a
АМф, СД1 AMφ, T1DM	24	151,76±29,62	162,00±21,07	608,33±217,48 ^a	693,60±145,63	0,41±0,01 ^b	0,45±0,04 ^b
	72	182,37±20,92	128,58±20,58 ^d	1136,75±302,10 ^{b, c}	863,83±398,04	0,45±0,16	0,31±0,05
МфС, ИЖ SMφ, IA	24	178,34±15,83	96,78±17,04 ^e	864,88±130,22	366,66±52,39 ^e	0,19±0,05	0,47±0,10
	72	100,560±2,215 ^e	96,12±9,51 ^e	442,37±5,70 ^e	261,76±3,39 ^{e, f}	0,33±0,12	1,06±0,27 ^{e, f}
МфС, СД1 SMφ, T1DM	24	223,19±9,23 ^f	79,21±59,11 ^g	834,57±71,58 ^f	434,33±210,36	0,59±0,06	0,22±0,07
	72	76,85±11,27 ^{e, g}	93,67±26,29 ^g	481,73±14,14	558,99±164,36	0,23±0,04 ^{e, f}	0,36±0,01

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток, принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$: ^a – от группы «АМф 24 ч, ИЖ»; ^b – от группы «АМф 72 ч, ИЖ»; ^c – от группы «АМф 24 ч, СД1»; ^d – от группы «АМф 72 ч, СД1»; ^e – от группы «МфС 24 ч, ИЖ»; ^f – от группы «МфС 72 ч, ИЖ»; ^g – от группы «МфС 24 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at $p < 0.05$: ^a, from "AM_φ 24 h, IA"; ^b, from "AM_φ 72 h, IA"; ^c, from "AM_φ 24 h, T1DM"; ^d, from "AM_φ 72 h, T1DM"; ^e, from "SM_φ 24 h, IA"; ^f from "SM_φ 72 h, IA"; ^g, from "SM_φ 24 h, T1DM".

Для анализа функциональной активности макрофагов в супернатантах исследуемых образцов оценивали продукцию следующих цитокинов: IL-1 α , IL-10 и TNF α . Концентрацию цитокинов рассчитывали на основе уравнения, описывающего зависимость оптической плотности от концентрации цитокина в калибровочных образцах. Оптическую плотность измеряли на гибридном фотометре Lazurite Automated Elisa System (Dy nex Technologies Inc., США) и с помощью наборов для иммуноферментного анализа на IL-1 α , IL-10 и TNF α крысы (BMS627, BMS629T WO и BMS622 соответственно; Bioscience, Ирландия).

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы STATISTICA.12. Вычисляли среднее арифметическое, ошибку среднего и стандартное отклонение. Определяли достоверность различий между образцами клеток, принадлежащих к одной популяции (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Морфометрический анализ стимулированных АДФН макрофагов представлен в таблице 1, он позволил выявить следующие закономерности: АДФН действует на все исследуемые популяции макрофагов вне зависимости от группы животных, из которых были выделены макрофаги; наиболее выраженные изменения происходят в течение 24-часового культивирования в присутствии 10 мкг/мл АДФН.

При культивировании АМф, выделенных из интактных животных, с АДФН в дозе 10 мкг/мл было отмечено увеличение площади ядра к 72 часам культивирования. У АМф, выделенных из животных с СД1 и культивированных с АДФН 10 мкг/мл, к 72 часам наблюдалось уменьшение значения исследуемого параметра. У МфС, вне зависимости от группы животных, из которых были получены клетки, при культивировании с исследуемой дозой АДФН значимое уменьшение площади ядра происходило в первые 24 часа культивирования (табл. 1).

ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ (АМф) И МАКРОФАГОВ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИИ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ

TABLE 2. PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM ϕ) AND SPLEEN (SM ϕ) MACROPHAGES ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10 μ g/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS

МФ и жив-е M ϕ and An-s	Время, час Time, hour	Экспрессия маркеров фенотипа M1 и M2 (усл. ед.) Expression of markers of phenotype M1 and M2 (RVU)			
		CD80 (M1)		CD163 (M2)	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AM ϕ , IA	24	0,401 \pm 0,190	0,312 \pm 0,190	0,315 \pm 0,160	0,158 \pm 0,030 ^a
	72	0,509 \pm 0,130	0,431 \pm 0,070	0,536 \pm 0,100	0,196 \pm 0,040 ^{a, b}
АМф, СД1/ AM ϕ , T1DM	24	0,271 \pm 0,130	0,346 \pm 0,030	0,113 \pm 0,020 ^{a, b}	0,297 \pm 0,090 ^c
	72	0,231 \pm 0,140	0,212 \pm 0,100	0,536 \pm 0,100	0,495 \pm 0,160 ^c
МфС, ИЖ SM ϕ , IA	24	0,220 \pm 0,050	0,274 \pm 0,070	0,189 \pm 0,030	0,174 \pm 0,050
	72	0,368 \pm 0,100	0,437 \pm 0,030 ^d	0,372 \pm 0,250	0,477 \pm 0,050 ^e
МфС, СД1/ SM ϕ , T1DM	24	0,138 \pm 0,050	0,368 \pm 0,160	0,244 \pm 0,060	0,314 \pm 0,130
	72	0,270 \pm 0,020 ^f	0,200 \pm 0,090	0,352 \pm 0,040 ^g	0,245 \pm 0,170

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела–Уоллиса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$: ^a – от «CD163 АМф 24 ч, ИЖ»; ^b – от «CD163 АМф 72 ч, ИЖ»; ^c – от «CD163 АМф 24 ч, СД1»; ^d – от «CD80 МфС 24 ч, ИЖ»; ^e – от «CD163 МфС 24 ч, ИЖ»; ^f – от «CD80 МфС 24 ч, СД1»; ^g – от «CD163 МфС 24 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at $p < 0.05$: ^a, from “CD163 AM ϕ 24 h, IA”; ^b, from “CD163 AM ϕ 72 h, IA”; ^c, from “CD163 AM ϕ 24 h, T1DM”; ^d, from “CD80 SM ϕ 24 h, IA”; ^e, from “CD163 SM ϕ 24 h, IA”; ^f, from “CD80 SM ϕ 24 h, T1DM”; ^g, from “CD163 SM ϕ 24 h, T1DM”.

ТАБЛИЦА 3. СЕКРЕТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МФ (АМф) И МФ СЕЛЕЗЕНКИ (МфС), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ (ИЖ) И ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ 30-СУТОЧНОГО СД1 (СД1) И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В ОТСУТСТВИЕ (КОНТРОЛЬ, К) И В ПРИСУТСТВИИ 10 мкг/мл АДФН (АДФН) В ТЕЧЕНИЕ 24 И 72 ЧАСОВ

TABLE 3. SECRETORY CHARACTERISTICS OF ALVEOLAR MACROPHAGES (AM_φ) AND SPLEEN MACROPHAGES (SM_φ) ISOLATED FROM INTACT ANIMALS (IA) AND ANIMALS WITH A MODEL OF 30-DAY-OLD T1DM (T1DM) AND CULTURED IN THE ABSENCE (CONTROL, C) AND IN THE PRESENCE OF 10 μg/ml ADPH (ADPH) FOR 24 AND 72 HOURS

МФ и жив-е Mφ and An-s	Время, час Time, hour	Синтез цитокинов, пкг/мл Synthesis of cytokines, pcg/ml					
		IL-1α		IL-10		TNFα	
		К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN	К C	АДФН ADPN
АМф, ИЖ AMφ, IA	24	563,33±47,18	771,67±58,47 ^a	144,41±59,32	240,25±37,21 ^a	416,75±69,03	1242,58±414,30 ^a
АМф, СД1 AMφ, T1DM	24	658,33±30,02	765,56±85,25	178,34±48,36	205,53±68,83	848,42±57,67 ^a	1545,92±318,41
	72	380,04±35,07 ^{a, b}	769,44±22,57 ^c	200,25±39,23	183,34±42,18	466,75±55,36 ^{a, b}	232,58±83,19 ^{a, b, c}
МфС, ИЖ SMφ, IA	24	667,78±41,17	787,78±15,56 ^a	130,25±41,30	185,32±24,07	360,92±64,68	547,58±78,86 ^a
МфС, СД1 SMφ, T1DM	24	752,22±79,93	503,33±53,57 ^{a, b}	165,74±17,02	151,38±32,47	988,42±219,58 ^a	1174,25±237,40 ^a
	72	507,22±82,80 ^{a, b}	768,33±94,23 ^b	106,92±27,33	144,47±28,37	955,08±406,62	466,75±227,16

Примечание. Определяли достоверность различий между образцами стимулированных и не стимулированных клеток принадлежащих к одной популяции и выделенных из обеих групп животных (ранговый анализ Краскела-Уоллиса). Различия считали достоверными при $p < 0,05$: ^a – от «К 24 ч, ИЖ»; ^b – от «К 24 ч, СД1»; ^c – от «К 72 ч, СД1».

Note. The significance of differences between the samples of stimulated and non-stimulated cells belonging to the same population and isolated from both groups of animals was determined (rank analysis of Kruskal-Wallis). The differences were considered significant at $p < 0.05$: ^a, from “C 24 h, IA”; ^b, from “C 24 h, T1DM”; ^c, from “C 72 h, T1DM”.

У АМф, выделенных из интактных животных в период 24-часового культивирования с 10 мкг/мл АДФН, происходило уменьшение площади клеток. К 72 часам значение данного параметра увеличивалось. Площадь клетки у АМф, выделенных из животных с СД1, не изменялась относительно не стимулированного контроля. У МфС, выделенных из интактных животных, стимуляция АДФН *in vitro* приводила к уменьшению площади клеток через оба срока культивирования (табл. 1).

Наиболее выраженное действие АДФН оказал на изменение параметра ЯЦО у МфС, выделенных из интактных животных к 72 часам культивирования клеток с веществом. Данный параметр был значимо увеличен относительно не стимулированного контроля (табл. 1).

Анализ экспрессии М1- и М2-маркеров фенотипов макрофагов представлен в таблице 2.

В условиях стимуляции 10 мкг/мл АДФН АМф, выделенных из интактных животных, на-

блюдалось снижение экспрессии CD163 через оба срока культивирования клеток. У АМф, выделенных из животных с СД1, с увеличением времени культивирования с АДФН наблюдалось усиление экспрессии CD163. Действие АДФН не было обнаружено в отношении экспрессии CD80 у альвеолярных макрофагов (табл. 2).

У МфС, выделенных из интактных животных и культивируемых в присутствии АДФН, к 72 часам было отмечено усиление экспрессии CD80 и CD163 относительно не стимулированного контроля. Действия АДФН на МфС, выделенных из животных с СД1, отмечено не было (табл. 2).

Анализ секреции цитокинов IL-1α, IL-10, TNFα представлен в таблице 3.

У АМф, выделенных из интактных животных и культивированных с 10 мкг/мл АДФН в течение 24 часов, происходило увеличение синтеза всех исследуемых цитокинов. Воздействие АДФН на АМф, выделенных из животных с СД1, приводило к увеличению синтеза IL-1α и уменьшению

синтеза TNF α к 72 часам культивирования с веществом. Продукция IL-10 к 72 часам культивирования под действием АДФН не менялась.

Синтез IL-1 α и TNF α к 24 часам культивирования с АДФН МФС, выделенных из интактных животных, также увеличивался. Макрофаги селезенки, выделенные из животных с СД1 и культивируемые в течение 24 часов, показывали повышенные уровни цитокинов IL-1 α и TNF α . Воздействие АДФН на эти клетки в течение 24 часов культивирования приводило к снижению уровня IL-1 α и увеличению уровня TNF α , тогда как культивирование с 10 мкг/мл АДФН в течение 72 часов, наоборот, приводило к увеличению IL-1 α и уменьшению TNF α . Уровень секреции IL-10 у МФС под воздействием АДФН не изменялся.

Обсуждение

Исследование показало влияние АДФН на секреторную активность макрофагов. Воздействие АДФН, как и в наших предыдущих исследованиях на различных моделях *in vivo*, изменяет количество медиаторов воспаления, таких как TNF α и IL-1 α до уровней, измеренных у интактных животных [3, 4]. Воздействие АДФН на макрофаги животных с СД1 через 24 часа культивирования также приводило к изменению морфометриче-

ских параметров (уменьшению размеров ядра и клетки макрофагов селезенки, увеличению размеров ядра альвеолярных макрофагов, росту ЯЦО у макрофагов селезенки) и синтетической активности клеток (повышению уровня IL-1 α и TNF α практически во всех популяциях клеток). Через 72 часа культивирования уровни IL-1 α и TNF α снижались у альвеолярных макрофагов, у макрофагов селезенки уровень TNF α снижался, а IL-1 α увеличивался.

Экспрессия поверхностноклеточных маркеров М1- и М2-фенотипов также была подвержена действию АДФН. В особенности, было отмечено увеличение экспрессии CD163 у стимулированных альвеолярных макрофагов, выделенных из животных с СД1.

Было показано, что альвеолярные макрофаги и макрофаги селезенки имеют морфометрическую, фенотипическую и синтетическую разнородность, которая зависит от состояния организма, органа выделения клеток и выполняемой этим органом функции. Необходимо отметить: краткосрочное культивирование клеток (24 часа) позволяет наиболее точно оценить цитокиновый профиль клеток, и это наблюдение должно учитываться при постановке экспериментов по репрограммированию фенотипа и цитокинового профиля макрофагов.

Список литературы / References

1. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Булавинцева Т.С. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент России № 2534411, 2014. Бюл. № 33. С.1-7. [Danilova I.G., Gette I.F., Bulavintseva T.S. Method for simulating alloxan diabetes. Russian Patent No. 2534411, 2014, Bull. No. 33, pp. 1-7.]
2. 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. 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 // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 35-44. [Danilova I.G., Emelianov V.V., Gette I.F., Medvedeva S.Y., Bulavintseva T.S., Cheresheva M.V., Sidorova L.P., Cheresheva V.A., Sokolova K.V. Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-diabetic rats, and its correction by 1, 3, 4-thiadiazine composition and lipoic acid. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 35-44. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-35-44.
3. Danilova I.G., Bulavintseva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 95, pp. 103-110.
4. Danilova I.G., Shafigullina Z.A., Gette I.F., Sencov V.G., Medvedeva S.Y., Abidov M.T. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 80, pp. 106-124.
5. Ginhoux F., Schultze J.L., Murray P.J., Ochando J., Biswas S.K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, pp. 34-40.
6. Guillermo A. D., Albert D. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, pp. 1-12.
7. Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 2001, Vol. 409, pp. 198-201.
8. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 723-737.

9. Ogawa K., Tsurutani M., Hashimoto A. et al. Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol.*, 2019, Vol. 20, p. 34. doi: 10.1186/s12865-019-0314-z.
10. Peach R.J., Bajorath J., Naemura J., Leytze G., Greene J., Aruffo A., Linsley P.S. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, pp. 21181-21187.
11. Song J.A., Yang H.S., Lee J., et al. Standardization of bronchoalveolar lavage method based on suction frequency number and lavage fraction number using rats. *Toxicol Res.*, 2010, Vol. 26, no. 3, pp. 203-208.
12. Sunahara K.K.S., Nunes F.P.B., Baptista M.A.P., Strell C., Westerberg L.S., Martins J.O. Insulin influences autophagy response distinctively in macrophages of different compartments. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2014, Vol. 34, no. 6, pp. 2017-2026.

Авторы:

Поздина В.А. — младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник научного отдела микробиологии и доклинических исследований, Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. — д.б.н., заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Абидов М.Т. — д.м.н., сотрудник Института иммунологии и профилактической медицины, Любляна, Словения

Authors:

Pozdina V.A., Junior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Scientific Department of Microbiology and Preclinical Research, Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Branch of National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Yekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abidov M.T., PhD, MD (Medicine), Employee, Institute of Immunology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

Поступила 15.06.2020
Принята к печати 01.07.2020

Received 15.06.2020
Accepted 01.07.2020