

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РАЗНОРОДНОСТЬ МАКРОФАГОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

© 2018 г. В. А. Поздина^{1,3}, М. В. Улитко², И. Г. Данилова¹

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделение
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

²Институт естественных наук и математики Уральский
Федеральный Университет, Екатеринбург, Россия

³Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии – филиал
ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Поступила: 12.05.2018. Принята: 20.06.2018

В работе были исследованы морфофункциональные характеристики макрофагов различной локализации в условиях культивирования. Исследование проводилось на культурах макрофагов крысы, выделенных из следующих областей: легкие, селезенка, печень и перитонеальная полость. Определялись следующие показатели: площадь клетки, количество и площадь ее ядер, ядерно-цитоплазматическое отношение. Фенотип и функциональная активность макрофагов оценивалась по экспрессии CD163, iNOS и по уровню продукции неспецифической эстеразы. В результате проведенных исследований были показаны особенности морфологии макрофагов различных органов, а также выявлены их функциональные отличия.

Ключевые слова: макрофаги, морфофункциональные особенности, локализация

DOI: 10.31857/S102872210002417-3

Адрес: 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Поздина Варвара Александровна.

Тел.: +79086387932. E-mail: varya.pozdina@inbox.ru

Авторы:

Поздина В. А., м. н. с. лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, м. н. с. лаборатории биомедицинских исследований УНИИФ ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

Улитко М. В., к. б. н., доцент департамента биологии и фундаментальной медицины Института естественных наук и математики УрФУ, Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д. б. н., заведующая лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

ВВЕДЕНИЕ

Макрофаги – клетки врожденного иммунитета, участвующие напрямую или опосредованно в защитных реакциях организма. Данные клетки также выполняют регуляторные функции, принимая участие в реакциях адаптивного иммунитета, в регенерации тканей, а также в регулировании обмена жиров и углеводов [1, 2, 3].

Сейчас не вызывает сомнений, что термин «макрофаги» объединят чрезвычайно разнород-

ную группу клеток, отличающихся и морфологически, и функционально. Высокоспециализированные группы макрофагов обнаружены практически во всех тканях организма [4]. Благодаря высокой гетерогенности, данный тип клеток играет важную роль в патогенезе различных заболеваний [5]. При поиске методов лечения болезней большой интерес представляет возможность воздействия на макрофаги. В связи с этим перед исследователями ставится задача, подробно изучить особенности функционирования различных популяций макрофагов, для того чтобы в дальнейшем исследовать реакции этих клеток на различные стимулы, в том числе и на иммуномодулирующие препараты.

Целью данной работы было исследование морфофункциональных характеристик популяций макрофагов из различных тканей в условиях культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались популяции макрофагов различной тканевой принадлежности (альвеолярные, перитонеальные, печеночные и селезеночные).

ночные макрофаги), полученные из самцов крыс 3 мес возраста породы Wistar. Все эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН (г. Екатеринбург, Россия), выполнен в соответствии с принципами, сформулированными в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета от 22 сентября 2012 года, о защите животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.) [6].

Для выделения перитонеальных макрофагов использовали методику Avijit Ray and Bonnie N. Dittel (2010) с модификациями [7]. В перитонеальную область производили инъекцию 3,5 мл охлажденной культуральной среды RPMI-1640 и 1,5 мл воздуха. При отсасывании суспензии использовали 5-миллилитровый стерильный шприц. Альвеолярные макрофаги получали из бронхоальвеолярной жидкости методом альвеолярного лаважа теплым раствором Хэнкса в объеме 3–4 мл [8]. Получение суспензии спленоцитов производили путём фрагментирования/гомогенирования извлеченной селезенки с небольшим количеством раствора Хэнкса [9]. Выделение макрофагов печени производили аналогичным путем (см. выделение суспензии спленоцитов), предварительно поместив печень в чашку Петри с раствором коллагеназы, которая необходима для разрушения соединительной ткани, способствуя тем самым высвобождению клеток [9].

Полученные суспензии клеток центрифугировали на холоде 5 минут при 1500g. Надосадочную жидкость сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл культуральной среды и разливали по 0,5 мл в на покровные стекла уложенные в 6-луночный планшет. Для культивирования перитонеальных, альвеолярных макрофагов и макрофагов селезенки использовалась культуральная среда RPMI-1480. Для макрофагов печени – DMEM. В обоих случаях в среду добавлялась сыворотка плодов коровы в количестве 5–10% от общего объема среды, а также гентамицин в концентрации 40 мкг/мл. Клетки выдерживали в течение часа в CO₂ инкубаторе (с концентрацией CO₂ равной 5%) при 37 °C. За это время макрофаги адгезировались к культуральной поверхности. По истечении часа среда с неприкрепившимися клетками сливалась, лунка аккуратно промывалась раствором Хэнкса, после чего в лунку или чашку Петри вновь заливался нужный объем питательной культу-

ральной среды. Далее клетки инкубировались в тех же условиях в CO₂ инкубаторе.

В качестве морфологических показателей определялись площадь клетки, количество и площадь ее ядер, ядерно-цитоплазматическое отношение. Эти параметры позволяют охарактеризовать синтетическую активность цитоплазмы и возраст ядра. Так же, известно, что изменение формы ядра и его количества, является важным признаком, который может свидетельствовать о различных функциональных изменениях [10].

Ферментативную (секреторную) активность макрофагов оценивали путем окрашивания на выявление неспецифической эстеразы – характерной для макрофагов лизосомальной гидролазы [11]. Расчет цитохимического индекса макрофагов проводился по принципу Астальди. Цитохимический индекс вычислялся по формуле, описанной ниже, где количество клеток, принадлежащих к каждой группе, умножается на соответствующий коэффициент, полученные числа суммируются и делятся на общее количество клеток.

$$\text{ЦХИ} = (0 \cdot A + 1 \cdot B + 2 \cdot C + 3 \cdot D) / (N),$$

где А – количество неокрашенных клеток, В – количество клеток, окрашенных слабо, С – число среднеокрашенных клеток, D – число клеток, окрашенных сильно, и N – общее число клеток.

Одновременно визуально оценивалась степень расплывчатости клеток, причем клетки делились на три группы: слабо расплывчатые – компактные округлые клетки, сильно расплывчатые – крупные клетки с неправильными очертаниями, и средне расплывчатые, занимающие промежуточное положение между двумя прежде упомянутыми группами.

С помощью иммуноцитохимического метода оценивалась функциональная фенотипическая активность макрофагов по уровню ими экспрессии рецептора CD163, высокие уровни которого характерны для макрофагов регуляторного фенотипа (M2), и продукции индуцибельной NO-синтазы, которая принимает участие в антимикробной и противоопухолевой активности, характерной для макрофагов воспалительного фенотипа (M1) [12, 13].

Для измерения морфологических и функциональных показателей стекло фотографировалось с помощью камеры AxioCam 512, подключенной к микроскопу Carl Zeiss Axio Observer D1 (УНИИФ), и программы ZEN. Фотографии с увеличением 100x (EC Plan-Neofluar 100x1.30 Oil M27) анализировались с использовани-

ем программы ZEN, где измерялись площади клеток, ядер и цитоплазмы, интенсивности окраски ядер, цитоплазмы и окрашенных областей иммуноцитохимическим способом CD163 и iNOS. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы STATISTICA.10. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были исследованы морфологические характеристики макрофагов различных популяций (таб. 1).

В целом, самыми крупными оказались перитонеальные макрофаги и альвеолярные макрофаги, которые в среднем крупнее селезеночных

Таблица 1. Сравнение морфологических показателей интактных макрофагов различных популяций

Тип макрофагов	Площадь клетки *	Количество ядер	Площадь ядер **	Ядерно-цитоплазматический индекс ***
Альвеолярные	1448,08 ± 26,51	1,02 ± 0,01	217,13 ± 60,17	0,18 ± 0,04
Перитонеальные	2249,94 ± 415,88	1,17 ± 0,03	232,26 ± 20,36	0,14 ± 0,07
Макрофаги селезенки	1434,43 ± 21,28	1,06 ± 0,02	195,52 ± 14,94	0,16 ± 0,02
Макрофаги печени	1103,25 ± 665,41	1,08 ± 0,03	170,60 ± 102,22	0,18 ± 0,01

Примечание: * – достоверные отличия от альвеолярных макрофагов, $p \leq 0,05$; * Площадь клетки: достоверных различия между альвеолярными и перитонеальными макрофагами; ** Площадь ядер: достоверные различия между альвеолярными макрофагами и макрофагами печени; *** Ядерно-цитоплазматический индекс: значимые различия отмечены только между альвеолярными и перитонеальными макрофагами.

Таблица 2. Результаты оценки эстеразной активности макрофагов различных популяций. Приводятся абсолютные значения и процентное соотношение макрофагов различной окрашенности и распластности

Тип клеток	Окрашенность	Степень распластности			Степень распластности, %		
		Слабая	Средняя	Сильная	Слабая (круглые клетки)	Средняя (средне распластанные)	Сильная (сильно распластанные)
Альвеолярные	A – Отсутствует	14,83	406,83	67,83	3,05%	60,30%	12,29%
	B – Слабая	96,83	45,00	0,00	13,82%	8,92%	0,00%
	C – Средняя	2,00	4,17	1,67	0,23%	1,00%	0,40%
	D – Сильная	0,00	0,00	0,00	0,00%	0,00%	0,00%
Печеночные	A – Отсутствует	479,58	102,92	35,00	36,11%	7,71%	2,62%
	B – Слабая	217,08	70,00	45,42	18,25%	5,66%	3,73%
	C – Средняя	115,00	109,58	42,50	9,83%	9,35%	3,61%
	D – Сильная	23,33	10,00	3,33	1,99%	0,85%	0,28%
Селезеночные	A – Отсутствует	281,20	389,44	78,24	28,75%	38,34%	7,27%
	B – Слабая	118,61	120,74	25,28	10,80%	11,54%	2,26%
	C – Средняя	1,67	4,72	3,33	0,25%	0,54%	0,26%
	D – Сильная	0,00	0,00	0,00	0,00%	0,00%	0,00%
Перитонеальные	A – Отсутствует	33,00	103,50	81,50	7,06%	25,39%	19,88%
	B – Слабая	194,50	27,50	4,00	40,39%	6,92%	0,36%
	C – Средняя	0,00	0,00	0,00	0,00%	0,00%	0,00%
	D – Сильная	0,00	0,00	0,00	0,00%	0,00%	0,00%

и печеночных клеток. Визуально популяции можно различить: среди альвеолярных макрофагов встречается большое количество характерных почти идеально круглых клеток с одним небольшим круглым ядром; остальные клетки в большинстве своем меньшей величины, округлые, интенсивно окрашивающиеся. Среди селезеночных же подавляющее большинство клеток небольшие, неправильной формы, и большую часть клетки у них так же занимает ядро.

По количеству ядер клетки всех популяций достаточно близки: большинство клеток имеет одно ядро, меньшее количество — два, и в редких случаях обнаруживается до 5 ядер. Наибольшим количеством клеток с более чем одним ядром характеризуются перитонеальные макрофаги.

Значение ядерно-цитоплазматического индекса оказалось у различных популяций достаточно близким, от $0,14 \pm 0,07$ у перитонеальных до $0,18 \pm 0,01$ у альвеолярных макрофагов печени.

Все популяции характеризуются низкой степенью экспрессии эстеразы (таб. 2).

Интересно, что в популяциях перитонеальных и альвеолярных макрофагов заметны признаки разделения макрофагов по M1 и M2 фенотипам. Провоспалительный M1 фенотип характеризуется слабо распластанными клетками, интенсивно секретирующими различные ферменты, в том числе эстеразу, тогда как для противовоспалительного фенотипа M2 характерны распластанные фибробластоподобные клетки с низкой секреторной активностью. Именно это наблюдается в популяциях альвеолярных и перитонеальных макрофагов: клетки, характеризующиеся низкой окрашенностью, распластаны слабо

или средне (13,82% и 8,92%, соответственно, для альвеолярных и 40,39% и 6,92% для перитонеальных), а клетки, не проявляющие секреторной активности, распластаны сильно или средне (12,29% и 60,30%, соответственно, для альвеолярных и 19,88% и 25,39% для перитонеальных). Однако для печеночных и селезеночных макрофагов такую тенденцию проследить не удается.

Таблица 3. Цитохимический индекс макрофагов различных популяций

Тип клеток	ЦХИ
Альвеолярные	$0,30 \pm 0,06$
Печеночные	$1,90 \pm 0,37$
Селезеночные	$0,44 \pm 0,31$
Перитонеальные	$0,75 \pm 0,41$

В таб. 3 приводятся значения цитохимического индекса для различных популяций макрофагов. Расчет этого показателя показывает, что наибольшая ферментативная активность характерна для печеночных макрофагов, у альвеолярных и селезеночных макрофагов она низка и существенно не отличается; перитонеальные макрофаги по количеству продуцируемой эстеразы занимают промежуточное положение.

Результаты анализа иммуноцитохимической окраски на CD163 и индуцибельной NO-синтазы представлены в таб. 4. В рамках анализа была измерена площадь окрашенного экспрессируемого участка клетки и оптическая плотность окраски.

В разных культурах клеток в пределах одной окраски CD163 или iNOS не было выявлено достоверных отличий по площадям экспрессируе-

Таблица 4. Результаты оценки экспрессии CD163 и активности индуцибельной NO-синтазы макрофагов различных популяций

Тип клеток	CD163		iNOS (индуцибельная NO-синтаза)	
	S экспрес. пов-ти, мкм ²	Оптическая плотность, ед	S экспрес. пов-ти, мкм ²	Оптическая плотность, ед
Альвеолярные	$134,92 \pm 118,40$	$3804,79 \pm 219,76$	$95,29 \pm 17,28 *$	$5876,00 \pm 164,15$
Перитонеальные	$115,50 \pm 60,88$	$4022,54 \pm 237,13 \#$	$52,44 \pm 27,74 *$	$6055,16 \pm 246,02$
Макрофаги селезенки	$242,52 \pm 88,67$	$4684,41 \pm 144,82\%$	$81,73 \pm 27,18$	$5451,33 \pm 422,85$
Макрофаги печени	$161,87 \pm 47,19$	$4321,65 \pm 330,00$	$61,20 \pm 0,69$	$5933,33 \pm 3,40$

Примечание: * — достоверные отличия S экспрес. поверхности iNOS от S экспрес. поверхности CD163, $p \leq 0,05$; # — достоверные отличия оптической плотности окраски CD163 между альвеолярными и перитонеальными макрофагами; % — достоверные отличия оптической плотности окраски CD163 между перитонеальными / альвеолярными макрофагами и макрофагами селезенки.

мой поверхности. Однако были выявлены существенные отличия в площадях экспрессируемой поверхности между окрасками CD163 и iNOS у альвеолярных и перитонеальных макрофагов. Были выявлены значительные отличия показателей оптической плотности по CD163 между следующими группами клеток: альвеолярные ($3804,79 \pm 219,76$), перитонеальные ($4022,54 \pm 237,13$) и селезеночные ($4684,41 \pm 144,82$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование продемонстрировало высокую морфологическую и функциональную гетерогенность макрофагов различных органов (альвеолярных, перитонеальных, печеночных и селезеночных). Так, по площади ядер исследованные клетки можно разделить на две группы: к одной принадлежат мигрирующие макрофаги — альвеолярные и перитонеальные, а к другой фиксированные — печеночные и селезеночные. По остальным показателям (площадь клетки, количество ядер и ядерно-цитоплазматическое отношение) перитонеальные макрофаги заметно превосходят прочие популяции макрофагов. Что позволяет предположить о высокой синтетической активности цитоплазмы этого вида клеток.

Анализ ферментативной активности макрофагов различных популяций показал, что максимальная ферментативная активность характерна для макрофагов печени, что укладывается в представления о том, что макрофаги могут принимать участие в регулировании обмена жиров и углеводов. Альвеолярные и селезеночные макрофаги секретируют минимальное количество эстеразы, а перитонеальные макрофаги занимают в этом отношении промежуточное положение.

Анализ фенотипических маркеров CD163 (M2-макрофаги) и iNOS (M1-макрофаги) показал, что в целом макрофаги, вне зависимости от их локализации, находятся в регуляторном состоянии. Площадь экспрессии CD163 во всех выделенных макрофагах существенно больше, чем площадь экспрессии iNO-синтазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Franken L.* Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cel. Microbiol.* 2016, 18 (4), 475–487.
2. *Gordon S.* The macrophage: past, present and future. *Europ. J. of Immunol.* 2007, 37(S1), S9–S17.
3. *Olefsky J. M.* Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Ann.Rev. of Phys.* 2010, 72, 219–246.
4. *Hopper K. E.* Macrophage. *Vox Sang.* 1979, 36, 257–214.
5. *Liddiard K.* Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Europ. J. of Immunol.* 2011, 41(9), 2503–2508.
6. *Красильщикова М. С., Белозёрцева И. В.* Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (перевод). Санкт-Петербург, 2012. 48 с. [*Krasilshchikova M. S., Belozyorceva I. V.* Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (translation). St. Petersburg, 2012. 48 p.]
7. *Avijit Ray, Bonnie N. Dittel.* Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J. of Visual. Exp.* 2010, 35, 1488.
8. *Виггинс Д.* Бронхоальвеолярный лаваж. Методика и применение. Пульмонология. 1991, 3, 43–46. [*Wiggins D.* Bronchoalveolar lavage. Methods and application. *Pulmonology.* 1991, 3, P. 43–46.]
9. *Timo L. M. ten Hagen, Wim Van Vianen, Irma A. J. M. Bakker-Woudenberg.* Isolation and characterization of murine Kupffer cells and splenic macrophages. *Journal of Immunology. Meth.* 1996, 1939 (1), P. 81–91.
10. *Шарафутдинова Л. А., Горшкова Е. Н., Садртинова И. И., Хисмадулина З. Р., Башкатов С. А.* Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. Биомедицина. 2014, 3, 49–53. [*L. A. Sharafutdinova, E. N. Gorshkova, I. I. Sadrtinova, Z. R. Khismadulina, SA Bashkatov.* Evaluation of the morphological parameters of neutrophilic granulocytes by atomic force microscopy after exposure to fullerene C60. *Biomedicine.* 2014, 3, P. 49–53.]
11. *Joseph Yourno, Peter Burkart, Walter Mastropaolo, Frank Lizzi, Anthony Tartaglia.* Monocyte nonspecific esterase. Enzymologic Characrization of a neutral serin esterase associated with myeloid cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1986, 34(6), 727–733.
12. *Onofre G1, Kolácková M, Jankovicová K, Krejsek J.* Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2009, 52(2), 57–61.
13. *Mungrue I. N., Husain M., Stewart D. J.* The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev.* 2002, 7(4), 407–422.

**MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF INTACTICAL MACROPHAGES
OF VARIOUS LOCALIZATION**© 2018 V. A. Pozdina^{1,3}, M. V. Ulitko², I. G. Danilova¹¹*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russia*²*Institute of Natural Sciences and Mathematics Ural Federal University Ekaterinburg, Russia*³*Ural Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology – branch of FGBU “NMIC FPI”,
Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia***Received:** 12.05.2018. **Accepted:** 20.06.2018

Morphofunctional characteristics of intact macrophages from different tissues were investigated under cultivation conditions. The study was carried out on rat macrophages isolated from the lungs, spleen, liver and peritoneal cavity. The following parameters were determined: the area of the cell, the area and the number of its nuclei, and the nuclear-cytoplasmic ratio. The phenotype and functional activity of macrophages were assessed according to the expression of CD163, iNOS and by the level of nonspecific esterase secretion. The morphological characteristics of intact macrophages from various organs were demonstrated and their functional differences were revealed.

Key words: macrophages, macrophage phenotype, macrophage characteristics

Authors:

Pozdina V. A., ✉ Junior Researcher, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Junior Researcher, Laboratory of Biomedical Research, UNIFE FGBU “NMIC FPI”, Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia;

620049 Ekaterinburg, Pervomaickaya str., 106, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79086387932. **E-mail:** varya.pozdina@inbox.ru;

Ulitko M. V., PhD, Associate Professor of the Department of Biology and Fundamental Medicine of the Institute of Natural Sciences and Mathematics of the UrFU, Ekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.