

С.В.Лямина¹, Ш.Л.Шимшелашвили², С.В.Калиш^{1,3}, Е.В.Мальшева¹, Н.П.Ларионов³, И.Ю.Мальшев^{1,4}

Изменение фенотипа и фенотипической пластичности альвеолярных макрофагов при заболеваниях легких, имеющих воспалительный компонент

1 – ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития РФ: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20 / 1;

2 – Институт стоматологии новых технологий: 121359, Москва, ул. Оршанская, 9, стр. 1;

3 – ГОУ ВПО "Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых": 600014, Владимир, ул. Белокопской, 6 / 31;

4 – ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

S.V.Lyamina, Sh.L.Shimshelashvili, S.V.Kalish, E.V.Malysheva, N.P.Larionov, I.Yu.Malyshev

Changes in phenotype and phenotypic flexibility of alveolar macrophages in inflammatory pulmonary diseases

Summary

We studied phenotypic specificity and flexibility of innate immunity cells, such as alveolar macrophages isolated from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial asthma (BA) and sarcoidosis which are lung diseases with inflammatory component. We found that M1 macrophages prevailed in COPD and sarcoidosis patients and M2 macrophages prevailed in BA patients though the macrophage populations were not monophenotypic. The investigation of macrophage phenotypic flexibility in COPD, BA and sarcoidosis demonstrated that different phenotypic markers show different macrophage phenotypic flexibility in COPD, BA and sarcoidosis. This fact allows suggestion that phenotypic flexibility is specific to a certain parameter (receptor, structural or functional flexibility). The obtained data extend our knowledge on pathogenesis of pulmonary diseases and can be used to develop a new approach for management of these diseases.

Key words: alveolar macrophages, inflammation, macrophage phenotype, phenotypic flexibility, pulmonary diseases.

Резюме

У пациентов с заболеваниями легких с воспалительным компонентом — хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), бронхиальной астмой (БА) и саркоидозом — была изучена фенотипическая принадлежность и фенотипическая пластичность клеток системы врожденного иммунитета — альвеолярных макрофагов, выделенных из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Показано, что при ХОБЛ и саркоидозе в БАЛЖ преобладали макрофаги М1-фенотипа, а при БА — М2-фенотипа, тем не менее популяции макрофагов не были монофенотипическими. При изучении фенотипической пластичности макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе установлено, что разные маркеры фенотипа дают разную картину сопоставления фенотипической пластичности макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе. Это позволяет рассматривать фенотипическую пластичность специфически к конкретному показателю (рецепторная, структурная, функциональная пластичность). Полученные данные помогают лучше понять патогенез заболеваний легких и могут быть использованы при разработке новых подходов в лечении данных заболеваний.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, воспаление, фенотип макрофагов, фенотипическая пластичность, заболевания легких.

Ежегодный рост заболеваемости, инвалидности и преждевременной смертности пациентов с респираторной патологией [1] по-прежнему делает весьма актуальным изучение патогенеза и поиск новых подходов к лечению заболеваний легких. Среди всех легочных заболеваний наиболее грозными являются хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), бронхиальная астма (БА) и саркоидоз. Они имеют разную этиологию и патогенез, однако общее, что их объединяет, — это наличие воспалительного компонента [2] и нарушений иммунного ответа в форме дисбаланса между клеточным Th1 и гуморальным Th2 звеньями иммунитета [3].

По какому пути пойдет развитие иммунного ответа (по Th1 или Th2), определяется клетками врожденного иммунитета — макрофагами. Показано, что в зависимости от природы действующего патогена, модулирующих медиаторов и микроокружения, макрофаги могут приобретать либо провоспалительный

М1-фенотип, либо альтернативный противовоспалительный М2-фенотип [4].

М1-макрофаги продуцируют много провоспалительных цитокинов, таких как IL-12 и TNF- α , NO и активных форм кислорода [4], которые обуславливают их бактерицидную активность. Маркерами М1 являются рецептор IL-2, MAPK-рецептор, CD80 и CD25, а также округлая форма макрофагов [4]. М2-макрофаги продуцируют много противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 [4]. Маркерами М2 являются маннозный рецептор, рецепторы SR-A и M60, CD163 и CD206, а также фибробластоподобная форма [4].

М1-макрофаги запускают Th1-ответ, который уничтожает бактерии, вирусы и опухолевые клетки, а М2-макрофаги — Th2-ответ, который убивает экстраклеточных паразитов. Кроме того, М2-макрофаги способствуют ремоделированию поврежденных тканей, ангиогенезу и опухолевому росту [4].

При развитии заболеваний легких макрофаги могут менять свой фенотип [5–7], поэтому можно предположить, что Th1/Th2-дисбаланс иммунного ответа при респираторной патологии связан с неадекватно формирующимся фенотипом макрофагов и нарушением их способности адекватно менять свой фенотип, т. е. с нарушением фенотипической пластичности макрофагов.

Среди факторов, которые могут влиять на фенотип макрофагов, значимую роль играют сыворотка [8], цитокины [4] и компоненты микроокружения, такие, например, как сурфактантный белок D [3]. Факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M1, были обозначены нами как ФРМ1, а факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M2, — как ФРМ2 [9]. Например, к ФРМ1 относятся IFN- γ и пониженные концентрации сыворотки, а к ФРМ2 — IL-4 и повышенные концентрации сыворотки.

В целом эти представления позволили нам поставить 2 важных вопроса, имеющих отношение к патогенезу заболеваний легких. Первый: меняется ли при этих заболеваниях фенотип альвеолярных макрофагов, и если да, то в какую сторону? И второй: нарушается ли при этих заболеваниях фенотипическая пластичность альвеолярных макрофагов? Цель работы состояла в изучении этих вопросов применительно к ХОБЛ, БА и саркоидозу.

Материалы и методы

В исследовании был использован материал 18 пациентов с ХОБЛ (средний возраст — $59,7 \pm 3,56$ лет), 16 — с БА (средний возраст — $48,4 \pm 3,28$ лет) и 23 — с саркоидозом (средний возраст — $42,4 \pm 4,2$ года). В исследование включались больные в стадии ремиссии.

Критериями исключения были: острый инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, недостаточность кровообращения II–III стадии, пароксизмальные нарушения ритма сердца; гипертонический криз, острые нарушения мозгового кровообращения; прием гормональных препаратов в течение 6 мес. до проведения исследования; дыхательная недостаточность III степени; онкологические заболевания; туберкулез; острые инфекционные заболевания; заболевания соединительной ткани с изменениями функции дыхательной системы; нарушения свертывающей системы крови; беременность или кормление грудью, а также в возраст моложе 18 и старше 70 лет.

Получение альвеолярных макрофагов

Исследования проводили на макрофагах, полученных из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Для получения БАЛЖ выполняли фибро-бронхоскопию в соответствии с методикой *T. Thum et al.* [10]. Все пациенты перед проведением фибро-бронхоскопии подписывали форму информированного согласия. Из БАЛЖ альвеолярные макрофаги выделяли в соответствии с методикой *P. Orosi et al.* [11].

Определение фенотипа альвеолярных макрофагов

Сразу после выделения из БАЛЖ макрофагов определялся их фенотип по поверхностно-клеточным маркерам CD25, CD80, CD163 и CD206. Для определения маркеров использовался метод проточной цитофлуориметрии и моноклональные антитела к CD80 и CD25 (*Beckman Coulter* CD80 и CD25), типичные для M1-фенотипа, и к CD163 и CD206 (*Beckman Coulter* CD163 и *BD Pharmingen* CD206), типичные для M2-фенотипа [4]. Подготовка проб макрофагов для анализа проводилась по инструкциям производителя. Оценивали процентное содержание маркеров M1- и M2-фенотипов среди всех выделенных макрофагов у конкретного пациента. О приобретении макрофагами M1-фенотипа свидетельствовало увеличение маркеров M1-фенотипа — CD80 и CD25, а о приобретении M2-фенотипа — увеличение маркеров M2-фенотипа — CD163 и CD206 [8].

Определение фенотипической пластичности макрофагов

Для оценки фенотипической пластичности, нами была разработана специальная методика, основанная на использовании стандартной сыворотки (FBS) в концентрации 0, 10 и 40 %. Сущность методики состояла в том, чтобы количественно оценить способность макрофагов менять свой фенотип в сторону M1 под действием ФРМ1 (0 % FBS) и в сторону M2 под действием ФРМ2 (40 % FBS). На 1-м этапе взвесь макрофагов делилась на 3 пула (пул 0, пул 1 и пул 2) и размещалась в плоскостонные лунки 48-луночных культуральных планшетов из расчета 0,5 млн клеток на лунку в 0,5 мл среды. Через час производилась замена питательной среды на свежую — RPMI 1 640, содержащую различные концентрации FBS (0, 10 и 40 %), а также 100 ед. / мл пенициллина и 100 мг / мл стрептомицина. С целью репрограммирования на M1-фенотип пул 0 культивировали при нормальной концентрации FBS — 10 % (стандартные условия), а пул 1 — при пониженной концентрации FBS — 0 % (ФРМ1). Пул 2 культивировали при повышенной концентрации FBS — 40 % (ФРМ2) с целью репрограммирования на M2-фенотип. По прошествии 12 ч процедуры репрограммирования для активации макрофагов добавлялся бактериальный липополисахарид (ЛПС) в концентрации 500 нг / мл на последующие 24 ч. После завершения всей 36-часовой процедуры репрограммирования и стимуляции ЛПС макрофаги снимали с планшетов путем добавления раствора EDTA и питательной среды RPMI 1 640 (1 : 1).

Степень изменения фенотипа под действием ФРМ, т. е. фенотипическую пластичность макрофагов, оценивали по изменению процентного содержания поверхностных маркеров фенотипа (см. выше). Дополнительно с помощью световой микроскопии подсчитывали количество макрофагов с распластанной фибробластоподобной формой (характерной для M2-фенотипа) и количество макрофагов с округлой формой (типичной для M1-макрофагов) [8] среди 100 клеток, подсчитанных в 5 полях зрения лунки.

Фенотипическую пластичность макрофагов выражали в следующих 3 показателях: 1) фенотипическая пластичность в сторону М1 (ФП-М1); 2) фенотипическая пластичность в сторону М2 (ФП-М2); 3) суммарная фенотипическая пластичность (ФП-М2-М1). ФП-М1, т. е. способность макрофагов менять свой фенотип с исходного в сторону М1, выражали как процент изменения маркеров фенотипа при действии ФРМ1 (0 % FBS). ФП-М2, т. е. способность макрофагов менять свой фенотип с исходного в сторону М2, — как процент изменения маркеров фенотипа при действии ФРМ2 (40 % FBS). ФП-М2-М1, т. е. суммарный диапазон изменений фенотипа макрофагов, выражали как процент изменения маркеров фенотипа при изменении фенотипа с М1 на М2. Значения маркеров, полученные при культивировании при нормальной 10%-ной концентрации FBS (ФРМ0), принимались за 100 %.

Статистический анализ данных осуществлялся с помощью программы *Statistica 8.0* (StatSoft, Inc.) с вычислением критерия достоверности Стьюдента (p). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Определение фенотипа макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе

При определении исходного фенотипа альвеолярных макрофагов сразу после их выделения оказалось, что в БАЛЖ, взятой от пациентов с ХОБЛ, БА и саркоидозом, присутствуют макрофаги обоих фенотипов — как М1 (провоспалительного), так и М2 (антивоспалительного) (таблица). При этом при ХОБЛ и саркоидозе большая часть макрофагов имела маркеры М1-фенотипа. При БА большая часть макрофагов имела преимущественно М2-фенотип.

Оценка фенотипической пластичности альвеолярных макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе

На рис. 1 представлены результаты изменения процентного содержания маркеров М1-фенотипа (CD25 и CD80) и М2-фенотипа (CD163 и CD206) при воздействии факторов репрограммирования на макрофаги больных разных групп: ФРМ1 (0 % FBS) и ФРМ2 (40 % FBS). Однако, прежде чем анализировать эти данные, следует учесть то обстоятельство, что определение маркеров фенотипа при тестировании фенотипической пластичности проводилось на макрофагах, которые находились в условиях культу-

ры клеток 36 ч, т. е. в условиях, отличающихся от тех, в которых макрофаги были в легких. За это время фенотип мог измениться под новые условия культуральной среды, другими словами "отмыться". Поэтому сначала необходимо определить, какие из маркеров наиболее долго фиксируют исходное состояние фенотипа макрофагов в условиях культуры клеток. Сравнение данных таблицы и рис. 1 позволяет это сделать.

Из таблицы видно, что оба маркера М1-фенотипа (CD25 и CD80) показали, что макрофаги непосредственно после выделения из легких пациентов с ХОБЛ и саркоидозом содержали почти в 2 раза больше клеток М1-фенотипа, по сравнению с больными БА. Соответственно оба маркера М2-фенотипа (CD163 и CD206) показали 2-кратное превышение клеток М2-фенотипа при БА, по сравнению с ХОБЛ или саркоидозом. Однако на рис. 1 видно, что после 36-часового культивирования в нормальных условиях при нормальной (10%-ной) концентрации FBS (ФРМ0) на преобладание М1-фенотипа клеток в макрофагах больных ХОБЛ и саркоидозом, по сравнению с БА, указывал только маркер CD80 и не указывал CD25 (рис. 1, ФРМ0). На преобладание М2-фенотипа клеток в макрофагах больных БА, по сравнению с ХОБЛ и саркоидозом, указывал только маркер CD206 и не указывал CD163 (рис. 1, ФРМ0).

Таким образом, М1-маркер CD80 и М2-маркер CD206 дольше фиксируют предшествующее состояние фенотипа при изменении условий, по сравнению с М1-маркером CD25 и М2-маркером CD163. Отсюда следует вывод: для определения фенотипической пластичности в условиях культуры клеток целесообразно использовать маркеры CD80 и CD206.

На рис. 2 представлены результаты изменения процентного содержания макрофагов круглой формы — маркера М1-фенотипа (в условиях культуры клеток) при воздействии на макрофаги ФРМ1 (0 % FBS) и ФРМ2 (40 % FBS). Хорошо видно, что в нормальных условиях культуры клеток при нормальной (10%-ной) концентрации FBS (ФРМ0) количество М1-макрофагов в группе БА значительно меньше, по сравнению с ХОБЛ ($p < 0,001$) и саркоидозом ($p < 0,05$). Это вполне соответствует различиям в фенотипе макрофагов, зафиксированным с помощью CD-маркеров сразу после выделения макрофагов из легких. Таким образом, форму клеток также можно использовать в качестве критерия фенотипической пластичности, тестируемой в условиях культуры клеток.

Таблица
Уровень экспрессии поверхностно-клеточных маркеров фенотипа на альвеолярных макрофагах, выделенных от больных ХОБЛ, БА и саркоидозом

Диагноз	М1-маркеры, %		М2-маркеры, %	
	CD80	CD25	CD163	CD206
ХОБЛ (n = 18)	44,76 ± 1,80	70,26 ± 2,20	31,71 ± 1,74	37,50 ± 1,23
БА (n = 16)	20,56 ± 1,26	38,21 ± 2,01	63,94 ± 1,76	66,03 ± 1,56
Саркоидоз (n = 23)	40,89 ± 3,43	69,73 ± 1,60	24,41 ± 2,08	27,18 ± 1,95

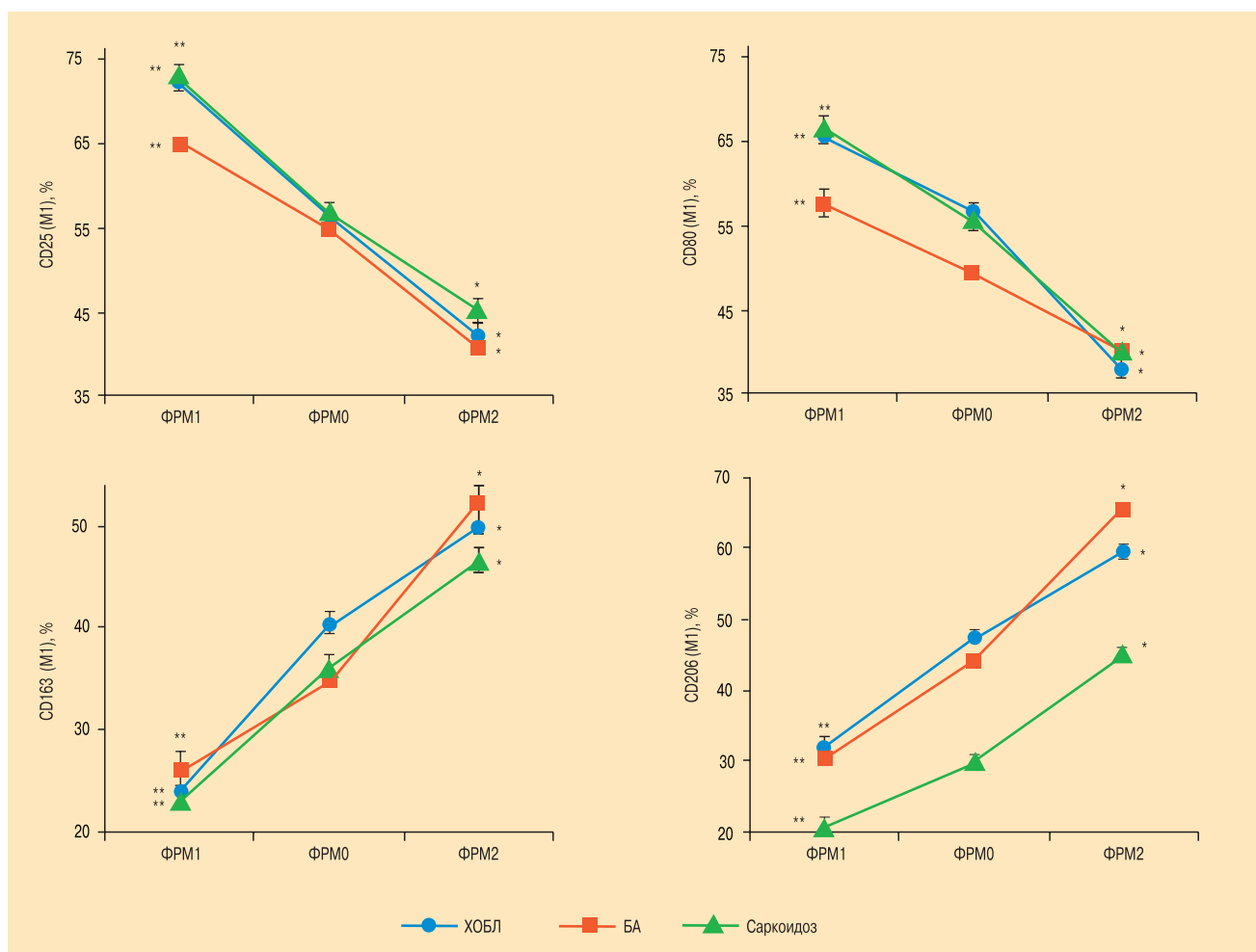


Рис. 1. Влияние факторов репрограммирования ФРМ1 (0 % сыворотки) и ФРМ2 (40 % сыворотки) на процентное содержание маркеров M1-фенотипа (CD25 и CD80) и M2-фенотипа (CD163 и CD206) на поверхности альвеолярных макрофагов, выделенных от больных ХОБЛ, БА или саркоидозом
Примечание: ФРМ0 – 10 % сыворотки, нормальные условия; * – $p < 0,05$ по сравнению с действием ФРМ1 (0 % сыворотки); ** – $p < 0,001$ по сравнению с действием ФРМ2 (40 % сыворотки).

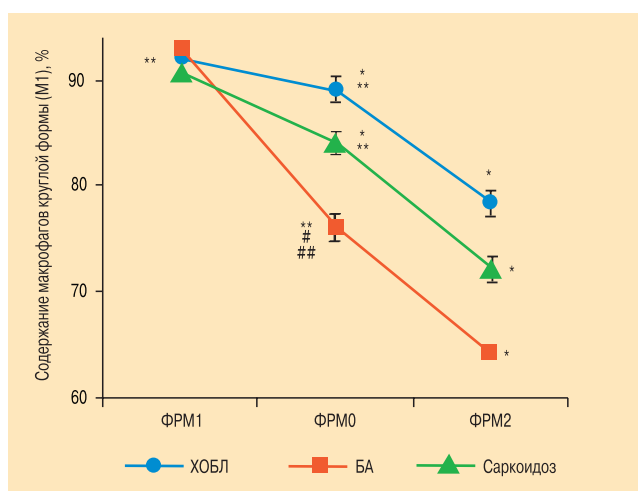


Рис. 2. Влияние факторов репрограммирования ФРМ1 (0 % сыворотки) и ФРМ2 (40 % сыворотки) на процентное содержание макрофагов круглой формы (маркера M1-фенотипа) в популяции альвеолярных макрофагов, выделенных от больных ХОБЛ, БА или саркоидозом
Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с действием ФРМ1 (0 % сыворотки); ** – $p < 0,001$ по сравнению с действием ФРМ2 (40 % сыворотки); # – $p < 0,05$ по сравнению с количеством макрофагов круглой формы при саркоидозе; ## – $p < 0,001$ по сравнению с количеством макрофагов круглой формы при ХОБЛ.

При сравнении фенотипической пластичности макрофагов (рис. 3), выделенных от больных с разными заболеваниями легких, можно обнаружить следующее:

1. Разные маркеры фенотипа дают разную картину сопоставления фенотипической пластичности макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе. Так, при использовании CD80 ФП-M1-M2 при ХОБЛ и БА примерно одинаковы (48 % и 47 % соответственно), но выше, чем при БА ($p < 0,001$). При использовании CD206 – другая картина, ФП-M1-M2 при БА и саркоидозе примерно одинаковы (79 % и 80 % соответственно), но выше, чем при ХОБЛ. И наконец, при использовании формы клеток как маркера фенотипа – третья картина: ФП-M1-M2 при БА выше (38 %), по сравнению с ХОБЛ и саркоидозом (15 % и 23 % соответственно; $p < 0,001$).
2. При сопоставлении способности макрофагов разных групп изменять свой фенотип в сторону M1 видно, что при использовании CD80 и CD206 эта способность, т. е. показатель ФП-M1, примерно одинаков ($p > 0,05$). Однако при использовании формы клеток как показателя фенотипа

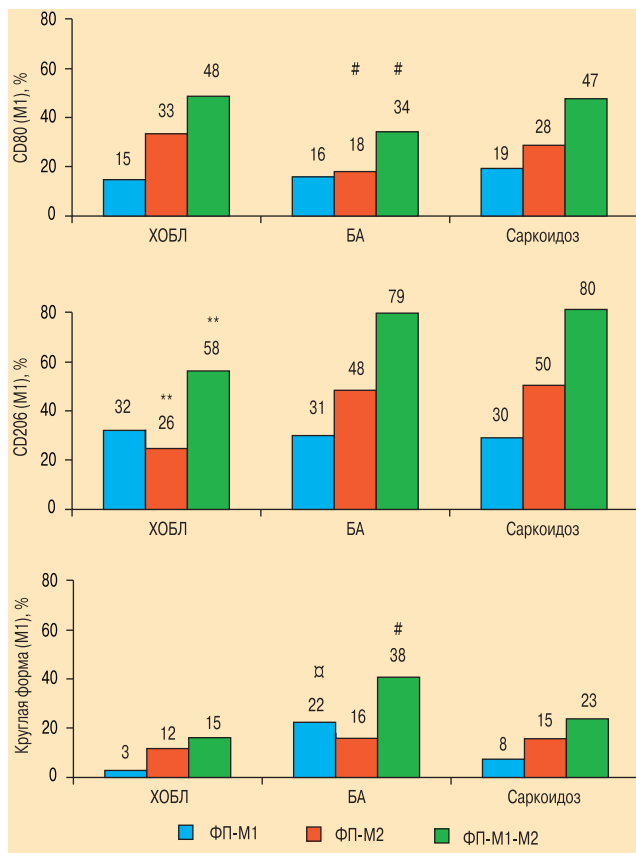


Рис. 3. Гистограммы фенотипической пластичности альвеолярных макрофагов больных ХОБЛ, БА и саркоидозом, построенные по результатам измерений CD80 (маркер M1), CD206 (маркер M2) и подсчета макрофагов с круглой формой (маркер M1). Примечание: ФП-M1 – фенотипическая пластичность в сторону M1; ФП-M2 – фенотипическая пластичность в сторону M2; ФП-M1-M2 – суммарная фенотипическая пластичность; # – $p < 0,001$ по сравнению с ФП-M1; * – $p < 0,001$ по сравнению с ФП-M1-M2 при БА и саркоидозе; ** – $p < 0,001$ по сравнению с ФП-M1-M2 при БА и саркоидозе.

видно, что ФП-M1 макрофагов при БА (22 %) существенно выше, чем при ХОБЛ и саркоидозе (3 % и 8 % соответственно; $p < 0,001$).

- При сравнении способности макрофагов разных групп изменять свой фенотип в сторону M2 при использовании разных маркеров фенотипа, также как и при оценке ФП-M1-M2, наблюдается разнонаправленная картина. Так, при использовании CD80 ФП-M2 при ХОБЛ и БА примерно одинаковы (33 % и 28 % соответственно) и выше, чем при БА (18 %) ($p < 0,001$). При использовании CD206 – другая картина: ФП-M2 при БА и саркоидозе примерно одинаковы (48 % и 50 % соответственно), но выше, чем при ХОБЛ (26 %; $p < 0,001$). И наконец, при использовании формы клеток как маркера фенотипа – третья картина: ФП-M2 при ХОБЛ, БА и саркоидозе примерно одинаковы (12, 16 и 15 % соответственно; $p > 0,05$).

Обсуждение

Анализ фенотипа альвеолярных макрофагов больных разными заболеваниями легких показал, что в популяции макрофагов, выделенных при ХОБЛ и саркоидозе, преобладал M1-фенотип, тогда как

в группе БА – M2-фенотип. Эти данные соответствуют существующим представлениям о том, что ХОБЛ и саркоидоз сопровождаются развитием иммунного ответа по Th1-типу [5], а БА – по Th2-типу [7]. Полученные нами данные указывают на причину развития Th1-ответа при ХОБЛ и саркоидозе, и Th2-ответа при БА. Очевидно, это связано с тем, что при ХОБЛ и саркоидозе макрофаги имеют преимущественно M1-фенотип, который запускает Th1-ответ [5], а при БА – M2-фенотип, который запускает Th2-ответ [7].

В связи с этим возникает вопрос: почему при ХОБЛ и саркоидозе макрофаги приобретают преимущественно провоспалительный M1-фенотип, а при БА – противовоспалительный M2-фенотип? На сегодняшний день, известно большое количество факторов, которые могут изменять фенотип макрофагов в сторону M1 или M2. Так, Th1-цитокины (IFN- γ , TNF- α), патоген-ассоциированные молекулярные комплексы – ЛПС, липопотеины, различные микроорганизмы, белки теплового шока, компоненты внеклеточного матрикса способны программировать макрофаги на M1-фенотип, тогда как Th2-цитокины (IL-4, IL-13), иммунореактивные комплексы с IL-1 β , IL-10, TGF- β , внутриклеточные патогены (*Coxiella burnetii*, *Leishmania*), витамин D3, глюкокортикоиды, апоптотические клетки способствуют формированию M2-фенотипа [4]. Очевидно, что анализ БАЛЖ больных ХОБЛ, БА и саркоидозом мог бы помочь ответить на вопрос: какие из присутствующих в БАЛЖ ФРМ могут программировать макрофаги?

Один из компонентов микроокружения альвеолярных макрофагов – сурфактантный белок D (SP-D) – заслуживает особого внимания. SP-D рассматривается как один из ключевых регуляторов функций альвеолярных макрофагов [12]. Этот белок обладает всеми признаками эндогенного ФРМ и, будучи в мономерной форме, может способствовать программированию макрофагов на M1-фенотип, а в мультимерной – на M2 [3, 12]. Если наша гипотеза о важной роли SP-D в программировании макрофагов [3, 12] верна, то можно ожидать, что в БАЛЖ больных ХОБЛ и саркоидозом SP-D будет обнаруживаться в мономерной форме, а у пациентов с БА – в мультимерной.

Таким образом, специфическое микроокружение может быть ответственно за специфическое для данной патологии программирование макрофагов.

Однако в связи с этим возникает еще один вопрос: почему популяция макрофагов, выделенная от одного больного, в одной и той же БАЛЖ, все же является гетерогенной (т. е. содержит как M1-, так и M2-фенотипы), а не монофенотипической? Отвечая на этот вопрос, можно предположить следующее:

- Микроокружение альвеолярных макрофагов в разных участках бронхоальвеолярного дерева все же различается, и этому, действительно, есть подтверждение [13].
- Фенотип макрофага не является статичным. В процессе выполнения своих функций, даже в одном и том же микроокружении, макрофаг постоянно

меняет свой фенотип (фенотипический континуум) [14]. Тогда понятно, что смывая БАЛЖ, мы получаем разные группы макрофагов, находящиеся на разных стадиях своей фенотипической дифференцировки.

- Мы обратили внимание на то, что в условиях культуры клеток, когда макрофаги сидят на пластике, в одной и той же культуральной среде, макрофаги, которые находятся в кластерах, имеют преимущественно округлую форму, т. е. М1-фенотип, тогда как изолированно сидящие макрофаги имеют расплюснутую форму, т. е. М2-фенотип (рис. 4). Не исключено, что адгезивные свойства макрофагов, которые могут зависеть от фенотипа, а также прямые межклеточные контакты или их отсутствие могут играть роль в приобретении макрофагом того или иного фенотипа. Можно предположить, что в легких макрофаги также имеют разный характер расселения (одиночный или групповой), и тогда гетерогенность фенотипа макрофагов может определяться этим фактором.

Дальше нами оценивалась фенотипическая пластичность макрофагов. Было обнаружено, что разные маркеры фенотипа дают разную картину сопоставления фенотипической пластичности макрофагов при ХОБЛ, БА и саркоидозе. Это означает, что не существует фенотипической пластичности макрофагов "вообще". Фенотипическую пластичность необходимо рассматривать специфически к конкретному показателю, например: спектр рецепторов (различные CD, рецепторная пластичность), форма клеток (морфологическая пластичность, под которой мы понимаем способность макрофагов менять свою внешнюю форму), продукция NO или цитокинов (функциональная пластичность) и т. д. Тогда возможно более корректно анализировать пластичность клеток. Так, полученные нами данные показали, что морфологическая пластичность (оценивается по форме клеток) макрофагов при БА выше, чем при ХОБЛ и саркоидозе, тогда как рецепторная пластичность, оцененная по CD80, у макрофагов при БА, наоборот, ниже, по сравнению с ХОБЛ и саркоидозом, а оцененная по CD25 — такая же, как при саркоидозе, и выше, чем при ХОБЛ (рис. 3).

Оценка фенотипа и фенотипической пластичности иммунных клеток в клинике может иметь большое значение. Фенотипическая пластичность, т. е. способность иммунных клеток быстро менять свой фенотип, играет ключевую роль в адекватном "терапевтическом" развитии иммунного ответа, ког-

да, например, первоначальный провоспалительный ответ (М1-макрофаги), направленный на уничтожение инфекции, должен смениться противовоспалительным (М2-макрофаги) с целью предупреждения избыточного воспаления и повреждения здоровых клеток и тканей. Не исключено, что патологическое снижение пластичности может играть роль в развитии провоспалительных заболеваний, когда макрофаги теряют способность менять свой фенотип на противовоспалительный (М2). Таким образом, оценка фенотипа макрофагов и их пластичности может иметь диагностическое значение.

Кроме того, оценка фенотипической пластичности иммунных клеток может показать, каковы резервы для коррекции патологического фенотипа. Например, уже давно в клинике легочных заболеваний используется глюкокортикостероид преднизолон. Недавно было показано, что этот гормон может репрограммировать макрофаги в сторону противовоспалительного М2-фенотипа [15]. Это означает, что противовоспалительный эффект преднизолона может определяться его репрограммирующим действием. Однако известно, что у некоторых больных, гормональная терапия бывает неэффективной. В свете выше изложенных представлений, это может объясняться тем, что макрофаги у таких больных теряют способность менять свой фенотип в сторону М2, т. е. у них нарушена фенотипическая пластичность. В этом случае предварительное определение фенотипической пластичности макрофагов может помочь в выборе адекватной терапии.

В целом полученные данные показывают, что определение фенотипа макрофагов и их пластичности может иметь самостоятельное диагностическое значение, а также быть основой для выбора лекарственной терапии и разработки новых способов коррекции патологического фенотипа макрофагов.

Авторы выражают признательность проф. Шмелеву Е.И., проф. Ловачевой О.В., проф. Попковой А.М., к. м. н. Игониной Н.П. за помощь в организации исследований и получении клинического материала.

Работа поддержана грантами ГК № П811 и ГК 16.740.11.0007 в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 гг.

Литература

- Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Департамент развития медицинской помощи и курортного дела ФГУ "Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения" Росздрава. Статистические материалы, 2009. www.mednet.ru
- Мальшев И.Ю., Лямина С.В., Шмигелашвили Ш.Л., Вассерман Е.Н. Функциональные ответы альвеолярных макрофагов, сурфактантный белок D и заболевания легких. Пульмонология 2011; 3: 101–107.
- Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю., Мальшев И.Ю. Новая стратегия управления иммунным ответом при заболеваниях легких — роль сурфактантного белка D как бивалентного фактора репрограммирования макрофагов. Фундамент. исслед. 2011; 1: 90–98.



Рис. 4. Одиночное расположение расплюснутых макрофагов (М2) и кластерное расположение округлых макрофагов (М1) на дне плоской культуральной лунки

4. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 1 (13): 453–461.
5. Löfdahl J.M., Wahlström J., Sköld C.M. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin. Exp. Immunol.* 2006; 145 (3): 428–437.
6. Pons A.R., Noguera A., Blanquer D. et al. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur. Respir. J.* 2005; 25 (4): 647–652.
7. Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2009; 180 (5): 38–395.
8. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164: 6166–6173.
9. Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю. и др. Альтернативное репрограммирование M1/M2 фенотипа перитонеальных макрофагов мышей in vitro с помощью интерферона гамма и интерлейкина 4. *Клеточ. технол. в биол. и мед.* 2011; 4: 235.
10. Thum T., Erpenbeck V.J., Moeller J. et al. Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and non-smokers. *Environ. Hlth Perspect.* 2006; 114 (11): 1655–1661.
11. Orosi P., Nugent K. Studies of phagocytic and killing activities of alveolar macrophages in patients with sarcoidosis. *Lung* 1993; 171 (4): 225–233.
12. Gardai S.J., Xiao Y.-Q., Dickinson M. et al. By binding SIRP-alpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 2003; 115: 13–23.
13. Drent M., Mulder P.G.H., Wagenaar S.S. et al. Differences in BAL fluid variables in interstitial lung diseases evaluated by discriminant analysis. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 803–810.
14. Грачев А.Н. Гетерогенность и функциональная пластичность макрофагов второго типа активации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.
15. Ikezumi Y., Suzuki T., Karasawa T. et al. Contrasting effects of steroids and mizoribine on macrophage activation and glomerular lesions in Rat Thy-1 mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am. J. Nephrol.* 2010; 31: 273–282.

Информация об авторах

Лямина Светлана Владимировна – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития России; тел.: +7-915-018-50-06; e-mail: svlvs@mail.ru
Шимшелашвили Шалва Левонович – к. м. н., глав. врач Института стоматологии новых технологий; тел.: +7-945-416-31-04; e-mail: Nameshalva26@mail.ru

Калиш Сергей Валерьевич – аспирант ГОУ ВПО "Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых", лаборант кафедры патологической физиологии лечебного факультета, ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития России; тел.: +7-965-401-74-33; e-mail: anahoretess@mail.ru

Малышева Елена Васильевна – д. м. н., проф. кафедры патологической физиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития России; тел.: +7-985-766-24-40; e-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

Ларионов Николай Павлович – д. м. н., проф. кафедры анатомии, физиологии человека, химии и безопасности жизнедеятельности ГОУ ВПО "Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых"; тел.: 8-422-233-69-19; e-mail: orgtrud@yandex.ru

Малышев Игорь Юрьевич – д. м. н., проф., зав. лабораторией клеточных биотехнологий ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет" Минздравсоцразвития России, зав. лабораторией стресса и адаптации ФГБУ "НИИ общей патологии и патофизиологии" РАМН; тел.: +7-985-766-24-40; e-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

Поступила 06.03.12
© Коллектив авторов, 2012
УДК 616.24-056.7-092