

С.В.Лямина<sup>1</sup>, Ш.Л.Шимшелашвили<sup>1</sup>, Т.Ю.Веденикин<sup>1</sup>, Е.В.Мальшева<sup>1</sup>, Н.П.Ларионов<sup>2</sup>, И.Ю.Мальшеев<sup>1,3</sup>

## Нарушение функционального фенотипа альвеолярных макрофагов при действии факторов риска хронической обструктивной болезни легких: возрастная и генетическая предрасположенность

1 – ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова" Минздрава России: 127473, Москва, ул. Десятая, 20 / 1;

2 – ФГБОУ ВПО "Владимирский государственный университет им. Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых": 600014, Владимир, ул. Горького, 87;

3 – УРАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

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

## Changes in alveolar macrophage functional phenotype under an influence of age and genetic susceptibility as risk factors for chronic obstructive pulmonary disease

### Summary

A definitive role of tobacco smoking as a risk factor for development of chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) is of no doubt today. We performed *in vivo* experimental modeling of COPD in mice of different genetic strains (C57 and Balb/c). We studied phenotypes of main cells of the innate immunity that are alveolar macrophages, and revealed genetic and age susceptibility to COPD in experimental animals. We showed that 1) there is a certain genetic susceptibility to hazardous exposition of tobacco smoke, probably, associated with proinflammatory M1 macrophage phenotype; 2) aging promotes transformation of macrophage phenotypes towards antiinflammatory M2 which is more expressed in mice macrophages with baseline genetically determined M1 phenotype (mice strain C57), and 3) long-time exposition to tobacco smoke enhances age-dependent macrophage transformation aside M2 phenotype, that is also more expressed in mice macrophages with genetically determined M1 phenotype (C57).

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, risk factors, macrophage phenotypes.

### Резюме

Роль табакокурения как фактора риска в развитии хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) является определяющей. В эксперименте *in vivo* проводилось моделирование ХОБЛ у мышей разных генетических линий (C57 и Balb/c). Изучены фенотипы основных клеток системы врожденного иммунитета легких – альвеолярных макрофагов. Выявлены генетическая и возрастная предрасположенности к развитию ХОБЛ у экспериментальных животных. Показана определенная генетическая предрасположенность к воздействию табачного дыма, возможно, связанная с провоспалительным M1-фенотипом макрофагов. Установлено, что увеличение возраста способствует трансформации фенотипа макрофагов в сторону противовоспалительного M2-фенотипа, более выраженного в макрофагах мышей с исходно генетически детерминированным M1-фенотипом (линия C57), а при длительном вдыхании табачного дыма усиливается возрастная трансформация макрофагов в сторону M2-фенотипа, также более выраженная в макрофагах мышей с генетически детерминированным M1-фенотипом (линия C57).

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, факторы риска, фенотипы макрофагов.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) вносит существенный вклад в повышение уровня инвалидизации населения и по прогнозам экспертов в самое ближайшее время займет 3-е место среди всех причин смерти [1]. В России в последние годы зарегистрировано от 2,4–11,0 млн больных ХОБЛ, а среди болезней органов дыхания ХОБЛ составляет > 55 % [2, 3]. Особую роль в развитии и распространности ХОБЛ играет табакокурение [4]. По данным Всемирной организации здравоохранения, 73 % случаев смерти от ХОБЛ обусловлены именно курением [4].

ХОБЛ относится к мультикомпонентной системной патологии [5], в которой нарушение иммунного ответа в легких играет наиболее важную роль [6]. Развитие иммунного ответа предопределяется глав-

ными клетками врожденного иммунитета – макрофагами. Показано, что в зависимости от природы действующего патогена, модулирующих медиаторов и специфического микроокружения, макрофаги могут приобретать либо провоспалительный M1-фенотип, либо альтернативно – противовоспалительный M2-фенотип [6, 7].

По сравнению с M2-фенотипом, M1-макрофагами продуцируется большое количество провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (IL)-12, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , NO и активных форм кислорода [7], которыми и обусловлена бактерицидная активность макрофагов. Маркерами M1 являются повышенная, по сравнению с M2 продукция NO, округлая форма макрофагов и поверхностно-клеточные рецепторы – рецептор IL-2 и MAPK-рецептор [7].

М2-макрофагами продуцируется большое число IL-10 [7]. Маркерами М2 являются меньшая продукция NO по сравнению с М1, фибробластоподобная форма и поверхностно-клеточные рецепторы, такие как маннозный рецептор и фагоцитарные рецепторы SR-A и M60 [7].

М1-макрофаги способствуют развитию Th1-ответа, который является киллером бактерий, вирусов и опухолевых клеток, тогда как М2, напротив, способствует развитию Th2-ответа, убивающего экстраклеточных паразитов, с его помощью происходит ремоделирование поврежденных тканей, ангиогенез и опухолевый рост [7].

Показано, что при развитии заболеваний легких, в зависимости от стадии, макрофаги могут менять свой фенотип в ту или иную сторону [8]. Поэтому логично предположить, что нарушение иммунного ответа при ХОБЛ может быть связано с неадекватно формирующимся фенотипом макрофагов. Следует также иметь в виду, что ХОБЛ развивается в течение длительного времени: несколько лет – у человека и несколько месяцев – у мышей.

Важно также, что М1- и М2-фенотипы могут быть генетически детерминированы. В результате исследования установлено, что у мышей линии C57 / BL6 выделен преимущественно М1-фенотип макрофагов, тогда как у мышей линии Balb / c – М2-фенотип [9]. Исходя из данного наблюдения, сформулированы следующие 3 вопроса, касающиеся патогенеза ХОБЛ:

1. Меняется ли фенотип альвеолярных макрофагов при воздействии факторов риска ХОБЛ, таких как табакокурение, а если меняется, то в какую сторону?
2. Зависят ли изменения фенотипа макрофагов от статуса исходного генетически детерминированного фенотипа этих клеток?
3. Каковы возрастные изменения фенотипа макрофагов и могут ли они способствовать развитию патологии легких при действии факторов риска ХОБЛ?

Целью данного исследования явился поиск ответов на поставленные вопросы.

## Материалы и методы

**Мыши.** Мышь является наиболее подходящим экспериментальным животным для моделирования и изучения ХОБЛ *in vivo* [10]. Мыши 2-месячного возраста линий C57/BL6 ( $n = 40$ ) массой тела  $22,0 \pm 1,5$  г и Balb/c ( $n = 40$ ) массой тела  $23,5 \pm 2,0$  г были получены из вивария ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России. Мыши каждой линии были рандомизированы на 2 группы: экспериментальная ( $n = 25$ ) и контрольная ( $n = 15$ ). По завершении моделирования ХОБЛ возраст мышей составлял 8 мес. Масса тела мышей линии C57/BL/6 в контрольной группе составляла  $23,5 \pm 1,5$  г, в группе экспериментальной ХОБЛ –  $24,0 \pm 1,5$  г. На момент окончания эксперимента у мышей линии Balb/c масса тела составляла  $25,0 \pm 1,5$  г, а в группе

экспериментальной ХОБЛ –  $23,0 \pm 1,5$  г. Животные находились в стандартных условиях вивария.

**Методика моделирования ХОБЛ.** Моделирование экспериментальной ХОБЛ *in vivo* воспроизводилось по протоколу хронического длительного вдыхания табачного дыма [10]. В соответствии с этим протоколом животные ежедневно 3 раза в день подвергались воздействию табачного дыма от 2 сигарет с интервалом между сеансами 4 ч на протяжении 6 мес. в специальной курительной камере. Дым из сигарет "Прима" (Россия) продуцировался с помощью курительного устройства (содержание на 1 сигарету: смолы – 1,3 мг; никотин – 0,8 мг; СО – 10 мг). Мыши, подвергшиеся процедуре длительного хронического воздействия табачного дыма, обозначалась как группа "курильщики".

**Культивирование макрофагов и оценка их фенотипа.** Мыши наркотизировались хлоралгидратом ( $32,5$  мг /  $100$  г массы тела, внутривенно). Альвеолярные макрофаги выделялись из бронхоальвеолярной лаважной жидкости мышей, которая центрифугировалась при комнатной температуре с макрофагами в течение 4 мин при  $1\ 000$  об. / мин. Супернатант отделялся, а осадок ресуспендировался в среде RPMI-1640 без сыворотки, взвесь клеток размещалась в плоскодонные лунки 48 луночных культуральных планшетов из расчета  $0,5$  млн клеток на 1 лунку в  $0,5$  мл среды. Через 1 ч среда заменялась новой средой RPMI 1 640 с 10%-ной сывороткой,  $100$  U / мл пенициллина и  $100$  мкг / мл стрептомицина; еще через 12 ч начиналась процедура определения фенотипа макрофагов. С этой целью к макрофагам добавлялся липополисахарид (ЛПС) в концентрации  $500$  нг / мл. Через 24 ч культивирования с ЛПС спектрофотометрически, по содержанию нитритов в культуральной среде с помощью реакции Грисса, оценивалась продукция NO макрофагами.

О приобретении макрофагами М1-фенотипа свидетельствовала высокая продукция NO при стимуляции ЛПС, а о приобретении М2-фенотипа, напротив – низкая продукция NO при стимуляции ЛПС [7].

## Результаты

### Оценка возрастных изменений фенотипа альвеолярных макрофагов мышей разных генетических линий

Анализ данных, представленных на рис. 1, позволяет не только оценить возрастные изменения фенотипа альвеолярных макрофагов у контрольных мышей за 6 мес. (время, в течение которого мыши экспериментальных групп подвергались воздействию табачного дыма), но и выделить интересные факты в отношении продукции NO: во-первых, альвеолярные макрофаги молодых мышей (2 мес.) C57 и Balb/c не различались по базальной исходной продукции NO ( $6,91 \pm 0,92$  мкМ и  $7,37 \pm 0,51$  мкМ соответственно;  $p > 0,05$ ). В период со 2-го по 8-й месяц жизни мышей у макрофагов обеих линий произошло примерно одинаковое достоверное снижение базальной продукции NO: с  $6,91 \pm 0,92$  до  $4,13 \pm 0,39$  мкМ

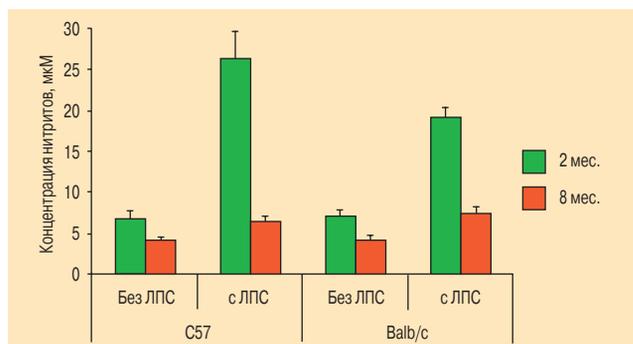


Рис. 1. Базальная и ЛПС-индуцированная продукция NO альвеолярными макрофагами мышей линии C57 и Balb/c в возрасте 2 и 8 мес. жизни

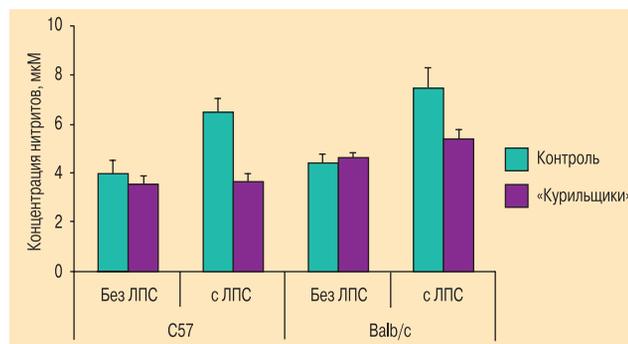


Рис. 2. Влияние хронического вдыхания табачного дыма на базальную и ЛПС-индуцированную продукцию NO альвеолярными макрофагами мышей линии C57 и Balb/c

( $p < 0,05$ ) – у C57, и с  $7,37 \pm 0,51$  до  $4,51 \pm 0,35$  мкМ ( $p < 0,05$ ) – у Balb/c. Во-вторых, у альвеолярных макрофагов молодых мышей (2 мес.) линии C57 в ответ на ЛПС продукция NO увеличилась значительно больше, чем у Balb/c. У макрофагов C57 она увеличилась  $\approx$  в 4 раза, тогда как у Balb/c – лишь в 2,6 раза. Эти данные соответствуют литературным данным о том, что макрофагами C57 продуцируется больше NO в ответ на ЛПС и, соответственно, имеется более выраженный M1-фенотип по сравнению с Balb/c [11]. Со 2-го по 8-й месяц жизни мышей у альвеолярных макрофагов обеих линий произошло достоверное снижение способности индуцировать продукцию NO в ответ на ЛПС. При этом возрастное угнетение индуцированной продукции NO у макрофагов C57 было выражено сильнее по сравнению с Balb/c: у C57 она снизилась с  $26,40 \pm 3,20$  до  $6,60 \pm 0,45$  мкМ, т. е. в 4 раза, тогда как у Balb/c – с  $19,21 \pm 1,20$  до  $7,57 \pm 0,72$  мкМ, т. е. лишь в 2,5 раза.

Таким образом, с возрастом в альвеолярных макрофагах происходит снижение как базальной, так и ЛПС-индуцированной продукции NO, однако в макрофагах C57 степень этого снижения выражена сильнее.

### Оценка влияния хронического длительного действия табачного дыма на фенотип альвеолярных макрофагов мышей разных генетических линий

На рис. 2 представлены данные о влиянии табачного дыма на NO-продуцирующую активность альвеолярных макрофагов мышей линий C57 и Balb/c. Анализ представленных на рис. 2 данных позволяет сделать выводы, что в результате длительного вдыхания табачного дыма наблюдается следующее:

- не отмечено достоверного влияния на базальную продукцию NO альвеолярными макрофагами ни у мышей линии C57, ни Balb/c;
- достоверно снижена ЛПС-индуцированная продукция NO макрофагами обеих линий: у C57 – с  $6,60 \pm 0,45$  до  $3,80 \pm 0,21$  мкМ ( $p < 0,05$ ), у Balb/c – с  $7,57 \pm 0,72$  до  $5,53 \pm 0,29$  мкМ ( $p < 0,05$ ).

Однако видно, что в группе "курильщиков" степень снижения в макрофагах C57 была больше по сравнению с таковой в группе Balb/c. В результате уровень индуцированной продукции NO макрофа-

гами у мышей-"курильщиков" C57 оказался ниже по сравнению с макрофагами мышей-"курильщиков" Balb/c ( $3,80 \pm 0,21$  vs  $5,53 \pm 0,29$  мкМ соответственно;  $p < 0,05$ ).

### Обсуждение

Судя по существенному снижению продукции NO маркера M2-фенотипа, в альвеолярных макрофагах мышей с возрастом происходит трансформация фенотипа в сторону противовоспалительного M2-фенотипа. При этом степень возрастного снижения продукции NO в макрофагах C57 по сравнению с Balb/c была выражена сильнее, т. е. была более сильной в генетически детерминированном M1-фенотипе.

При длительном вдыхании табачного дыма снижается способность альвеолярных макрофагов к индуцированной продукции NO и таким образом усиливается возрастная трансформация макрофагов в сторону противовоспалительного M2-фенотипа. При этом фенотип-трансформирующий эффект табачного дыма оказался более выраженным в макрофагах у мышей линии C57, которые исходно генетически имели M1-фенотип, по сравнению с макрофагами мышей с M2-фенотипом линии Balb/c.

Таким образом, при длительном хроническом действии табачного дыма патология легких развивается на фоне существенного возрастного снижения индуцибельности систем генерации NO альвеолярных макрофагов и, вероятно, трансформации их фенотипа в сторону M2. Эти эффекты табачного дыма более выражены у животных, которые имеют генетически детерминированный M1-фенотип макрофагов, что может быть связано с процессами, происходящими при его воздействии:

1. Снижение NO-продуцирующей способности макрофагов (дополнительно к фактору возраста) обуславливает прекращение защитных функций NO в легких (ограничение окислительного стресса, регуляция тонуса сосудов легких и ингибирование адгезии лейкоцитов) [12]. Также известно, что под воздействием табачного дыма снижается продукция NO в легких [13]. В результате данного исследования показана и впервые подтверждена генетическая детерминированность этого эффекта.

Однако серьезных изменений в гистологической картине легких мышей-"курильщиков" по сравнению с контролем, а также серьезных различий между группами мышей-"курильщиков" разных генетических линий (данные не представлены) не обнаружено. В данной ситуации отражен известный в биологии феномен опережения изменения функции по сравнению с изменением структуры. Для клинической картины важно, что изменение функционального фенотипа макрофагов может служить ранним диагностическим критерием неблагоприятных изменений иммунитета в легких.

- Основной вклад в развитие патологии легких вносит не столько индуцированная табачным дымом трансформация фенотипа макрофагов, сколько прямое токсическое действие компонентов дыма (никотин, смола, оксид углерода, полициклические ароматические углеводороды, нитрозамины, формальдегиды и ароматические амины) [14]. Токсическое действие этих компонентов на ткани легкого доказаны в работах *J.H. Owing et al.* [14].
- Не исключено, что оба фактора — и трансформация фенотипа макрофагов, и прямое токсическое влияние — играют роль в развитии патологии легких при действии табачного дыма. Действительно, известно, что не у всех курящих людей даже при длительном курении развивается ХОБЛ. Возможно, у этих людей имеется генетически более устойчивый к патологической трансформации фенотип макрофагов. Однако клинических исследований, проведенных среди курильщиков с большим стажем с ХОБЛ и без таковой, пока недостаточно.

Также в результате исследования установлено, каким образом следует интерпретировать трансформацию фенотипа макрофагов в сторону M2 при длительном воздействии табачного дыма: как патогенетическую или как защитную компенсаторную. Животные с исходно генетически детерминированным на провоспалительный M1-фенотип макрофагами (линия C57) более уязвимы к действию факторов риска ХОБЛ, т. к. при этом заболевании имеется выраженный провоспалительный компонент [6], поэтому дополнительная генетическая предрасположенность иммунитета к провоспалительному ответу может способствовать патологии легких при действии факторов риска ХОБЛ. С этой точки зрения трансформацию фенотипа макрофагов в сторону противовоспалительного M2-фенотипа, очевидно, можно рассматривать как защитную реакцию иммунитета, направленную на ограничение воспаления при воздействии табачного дыма.

Вместе с тем во многих случаях развития самых разных заболеваний чрезмерное развитие эндогенного защитного компонента трансформируется в звено патогенеза. Действительно, чрезмерная трансформация фенотипа макрофагов в M2-фенотип может привести к значительному снижению продукции NO в легких и угнетению NO-зависимых защитных механизмов [12]. Кроме того, M2-фенотип является

проопухолевым фенотипом, который способствует ангиогенезу, инвазии и метастазированию опухолевых клеток и подавлению антиопухолевой иммунной защиты [7]. Не исключено, что этот механизм играет важную роль в развитии опухоли легких у больных ХОБЛ. В работе *de J.P. Torres* [15] показано, что у 10 % больных ХОБЛ в течение 5 лет развиваются опухоли легких.

## Заключение

Несмотря на нерешенные вопросы о возможности коррекции патологически измененного фенотипа и использовании фенотипа макрофага в качестве диагностического и прогностического маркера при заболеваниях легких, показано, что исследование роли фенотипической трансформации альвеолярных макрофагов — перспективное направление для решения теоретических и клинических проблем ХОБЛ и других заболеваний легких.

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

## Литература

- Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI / WHO workshop report: Updated 2006.
- Шмелев Е.И.* Амбулаторное лечение больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (результаты Всероссийской программы "Свобода"). *Consilium Medicum* 2007; 10: 30–35.
- Синопальников А.И., Романовских А.Г.* Инфекционное обострение хронической обструктивной болезни легких: современные подходы к диагностике и терапии. *Справочник поликлинического врача* 2007; 11: 46–57.
- Mannino D.M., Buist A.S.* Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370 (9589): 765–773.
- Авдеев С.Н.* Хроническая обструктивная болезнь легких как системное заболевание. *Пульмонология* 2007; 3: 7–12.
- Мальшев И.Ю., Лямина С.В., Шимшелава Ш.Л. Вассерман Е.Н.* Функциональные ответы альвеолярных макрофагов, сурфактантный белок D и заболевания легких. *Пульмонология* 2011; 3: 101–107.
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.* Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 1 (13): 453–461.
- Lofdahl J.M., Wahlstrom J., Skold 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.
- Tumitan A.R., Monnazzi L.G., Ghiraldi F.R. et al.* Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51 (10): 1021–1028.
- Joos G.F.* Cigarette smoke in mice, rats and guinea-pigs: value to the study of pathogenic factors involved in COPD. Experimental models for COPD and asthma. In: 15 European respiratory congress. Copenhagen; 2005. 9–38.

11. Huang J., DeGraves F.J., Lenz S.D. et al. The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates Chlamydia-induced disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 2002; 99 (6): 3914–3919.
12. Grisham M.B., Jourdain D., Wink D.A. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am. J. Physiol. 1999; 276 (2): G315–G321.
13. Schilling J., Holzer P., Guggenbach M. et al. Reduced endogenous nitric oxide in the exhaled air of smokers and hypertensives. Eur. Respir. J. 1994; 7: 467–471.
14. Zander D.S., Popper H.H., Jagirdar J. Molecular pathology of lung diseases. Springer Science + Business Media, LLC; 2008.
15. de Torres J.P., Marin J.M., Casanova C. et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease – incidence and predicting factors. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011; 184 (8): 913–919.

**Информация об авторах**

Лямина Светлана Владимировна – к. м. н., ст. научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (915) 018-50-06; e-mail: svlvs@mail.ru

Шимшелашвили Шалва Леванович – к. м. н., главный врач Института стоматологии новых технологий; тел.: (945) 416-31-04; e-mail: Nameshalva26@mail.ru

Веденикин Тимофей Юрьевич – студент, ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (903) 682-27-97; e-mail: vedenikin@yandex.ru

Малышева Елена Васильевна – д. м. н., профессор кафедры патологической физиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (985) 766-24-40; e-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

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

Малышев Игорь Юрьевич – д. м. н., профессор, зав. лабораторией клеточных биотехнологий ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России, зав. лабораторией стресса и адаптации ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН; тел.: (985) 766-24-40; e-mail: igor.malyshev@mtu-net.ru

Поступила 18.12.13  
© Коллектив авторов, 2013  
УДК 616.24-036.12-092