

УДК 576.5:576.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-167-176

Для цитирования: Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Эффекты мезенхимальных стромальных клеток на дифференцировку макрофагов первого типа и их переключение в макрофаги второго типа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 167–176.

Эффекты мезенхимальных стромальных клеток на дифференцировку макрофагов первого типа и их переключение в макрофаги второго типа

Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Известно, что мезенхимальные стромальные клетки (МСК) способны направлять и переключать дифференцировку непримированных макрофагов (Мф) или Мф I типа (M1) в направлении Мф II типа (M2).

Целью работы явилось исследование способности МСК индуцировать переключение M1 в M2 на основе сравнительного анализа эффектов МСК на поляризованные M1 и моноциты, стимулированные гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором к M1-дифференцировке.

Материалы и методы. В условиях, блокирующих прямые межклеточные контакты (Transwell-система), МСК сокультивировали с моноцитами в течение 7 сут или с M1 в течение 48 ч. Характеристика генерированных таким образом Мф включала оценку экспрессии CD206, аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов и способности секретировать про- и противовоспалительные медиаторы.

Результаты. Сокультивирование МСК и M1 приводило к появлению у них фенотипических (усиление экспрессии CD206) и функциональных (снижение аллостимуляторной активности) свойств M2. В то же время в результате сокультивирования МСК и моноцитов в M1-индуцирующей среде генерировались Мф с выраженной стимулирующей активностью в СКЛ, аналогичной таковой у M1 (3,45 и 3,4 расч. ед.; $p = 0,46$) и значительно превышающей аллостимуляторную активность M2 (3,45 vs 2,2 расч. ед.; $p = 0,03$). При этом МСК не влияли на уровень экспрессии CD206, а также на характер продукции про- (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) и противовоспалительных (IL-1-га, IL-4, IL-10) цитокинов, иммунорегуляторных цитокинов (IFN- γ , IL-17) и хемокинов (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin).

Выводы. Способность МСК индуцировать фенотип M2 зависит от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда. В культурах поляризованных M1 МСК способствуют переключению M1 в M2. В то же время при культивировании МСК с моноцитами в M1-индуцирующей среде формируется популяция M1-подобных Мф, отличающихся высокой аллостимуляторной активностью и характерным для M1 спектром продуцируемых цитокинов и хемокинов.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, моноциты, макрофаги, M1→M2 поляризация, цитокины, хемокины.

✉ Шевела Екатерина Яковлевна, e-mail: shevelak@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтический потенциал МСК во многом связывают с их противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами. Особый интерес в этом аспекте представляют взаимодействия МСК и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, которые по последним данным играют важную роль в опосредовании клинического эффекта МСК *in vivo*. Макрофаги (Мф) характеризуются высокой пластичностью и в зависимости от условий активации и (или) микроокружения могут приобретать функциональный фенотип М1 или М2 [1]. Макрофаги I типа (М1) обладают выраженными провоспалительными свойствами, активируют иммунный ответ по первому типу. Напротив, макрофаги II типа (М2) отличаются противовоспалительной и репаративной активностью и активируют иммунный ответ по II типу [2]. Исследования в моделях сепсиса [3], инфаркта миокарда [4], токсического повреждения легких [5], бронхиальной астмы [6], спинальной травмы [7], ишемии задних конечностей [8] показали, что восстановление функции поврежденного органа и выживаемость животных на фоне трансплантации МСК обусловлены активацией макрофагов фенотипа М2. Аналогичные данные о способности МСК индуцировать фенотип М2 получены также *in vitro* [9]. Поляризирующий эффект МСК на Мф проявляется в усилении экспрессии М2-ассоциированных маркеров и фагоцитарной активности, снижении продукции провоспалительных цитокинов и увеличении противовоспалительных и супрессорных факторов (PGE₂, TSG-6, IL-6, IDO, TGF-1) [3, 10–12], а также появлении способности индуцировать регуляторные Т-клетки [13].

Изучение влияния МСК на моноциты/макрофаги представляет интерес не только в прикладном, но также и в патогенетическом аспекте, поскольку многие патологические состояния, связанные с избыточным или длительно персистирующим воспалением и нарушением репаративных процессов, обусловлены дисбалансом клеток М1 и М2 [14–16]. Важно отметить, что большая часть результатов по изучению влияния МСК на Мф получена на экспериментальных животных и клеточных линиях. Исследования у человека немногочисленны и в основном сводятся к анализу взаимодействий МСК с интактными или поляризованными макрофагами. Вместе с тем вопрос о влиянии МСК на моноциты, в частности дифференцировку моноцитов в М2 в условиях М1-индуцирующего микроокружения, остается открытым. Исходя из вышеизложенного, целью настоящего

исследования явилось исследование способности МСК конвертировать фенотип М1 (индуцировать М1→М2 переключение) на основе сравнительного анализа эффектов МСК на поляризованные макрофаги М1 и на моноциты периферической крови, стимулированные к М1-дифференцировке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генерация МСК. Предшественники МСК получали из аспирата костного мозга в результате адгезии мононуклеарных клеток (МНК) на поверхности флаконов для культивирования (TPP, Швейцария). После удаления фракции неприлипающих клеток (через 3–5 сут) адгезивные предшественники МСК культивировали до получения монослоя в питательной среде αMEM (Sigma-Aldrich, Германия) с 10% фетальной сыворотки телят (FCS, NuClone) при полном обновлении среды 1 раз в неделю. Диссоциацию МСК при пассировании проводили 0,25%-м раствором трипсин-версена («Биолот», Новая Зеландия, Россия). Полученные таким образом МСК экспрессировали стромальные антигены (CD90, CD105), не экспрессировали линейные антигены (CD3, CD20, CD14) и маркеры гемопоэтических клеток (CD34) и проявляли выраженную супрессорную активность в отношении КонА-стимулированных Т-лимфоцитов (от 46 до 63% супрессии при соотношении МСК : МНК 1 : 2).

Генерация макрофагов. Мф генерировали из моноцитов (прилипающей фракции МНК, $3-5 \times 10^6$ /мл) периферической крови здоровых доноров в 6-луночных планшетах (TPP, Швейцария). Макрофаги I типа генерировали из моноцитов в М1-индукционной среде, состоящей из культуральной среды RPMI-1640, дополненной 0,05 мМ 2-меркапэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% раствора незаменимых аминокислот (все реактивы Sigma-Aldrich, Германия), 100 мг/мл гентамицина, в присутствии рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (rhGM-CSF, 50 нг/мл, Sigma-Aldrich, Германия), 10% FCS в течение 7 сут при 37 °С и 5% CO₂. Макрофаги II типа получали по разработанному нами ранее протоколу [17], в соответствии с которым адгезивную фракцию МНК ($3-5 \times 10^6$ /мл) культивировали также в присутствии rhGM-CSF (50 нг/мл) в М2-индукционной среде (RPMI-1640 с вышеупомянутыми добавками, но в условиях депривации ростовых факторов сыворотки – 2% аутоплазмы). Относительное содержание CD206+

Мф в гейте CD14-позитивных клеток оценивали методом двухцветной проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur) с использованием PE-меченных анти-CD20₆ и FITC-меченных анти-CD14 моноклональных антител (BD, США).

Сокультивирование МСК и моноцитов. МСК, находящиеся во «вкладышах» (размер пор 0,4 мкм, Millipore, США), помещали в лунки 6-луночного планшета, где находились моноциты или М1 в М1-индукционной среде, и культивировали при 370 °С в CO₂-инкубаторе в течение 7 сут (для моноцитов) или 48 ч (для М1). Соотношение МСК : Мф составляло 1 : 1 или 1 : 2, что соответствовало дозе МСК с наиболее выраженной иммуносупрессивной активностью. В качестве контроля использовали культуры моноцитов/М1 без МСК, а также генерированные М2. Диссоциацию макрофагов по окончании культивирования проводили с помощью 0,25%-го трипсин-версена с последующим определением фенотипа (CD206) и аллостимуляторной активности.

Аллостимуляторная активность Мф. Способность Мф стимулировать пролиферацию Т-клеток оценивали по интенсивности пролиферативного ответа в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров (1×10^5 /лунку), стимуляторами служили аллогенные М1 или М2 в соотношении МНК : Мф = 10 : 1. Пролиферативный ответ в СКЛ оценивали на 5-е сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс стимуляции Мф (ИСМф) в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Секреторная активность Мф. Концентрацию 27 цитокинов оценивали в 7-суточных супернатантах культур макрофагов методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Данные представлены в виде средних значений (M) и стандартной ошибки ($S.E.$), а также в виде медианных значений (Me) и квартильного диапазона ($LQ-UQ$, 25–75% квартили). При сравнении вариационных рядов использовали непараметрические критерии для связанных (критерий Вилкоксона для связанных выборок) и несвязанных (критерий Манна-Уит-

ни) выборок. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было показано, что одним из характерных признаков М2 макрофагов является их низкая аллостимуляторная активность в СКЛ [17, 18]. Поэтому для оценки М2-поляризующего эффекта костномозговых МСК на М1 макрофаги мы сравнили аллостимуляторную активность М1 клеток, прекультивированных в течение 48 ч в отсутствие и присутствии МСК (М1+МСК) в Transwell-системе. В качестве дополнительного контроля в нескольких экспериментах использовали М2, полученные по разработанному нами протоколу. Как видно из данных рис. 1, а, способность М1+МСК макрофагов стимулировать пролиферацию Т-клеток была существенно снижена по сравнению с М1 (ИС_{Мф} 1,9 против 3,6 расч. ед.; $p < 0,05$) и аналогична уровню аллостимуляторной активности М2 (2,2 расч. ед.).

Сравнительный анализ экспрессии М2-ассоциированной молекулы CD206 показал, что 48-часовая преинкубация М1 с МСК сопровождалась возрастанием как уровня экспрессии маннозного рецептора (рис. 1, б), так относительного содержания CD206-позитивных макрофагов (рис. 1, с). Полученные данные свидетельствуют о том, что поляризованные М1 в результате взаимодействия с МСК приобретали функциональные (низкая аллостимуляторная активность) и фенотипические (повышенная экспрессия CD206) свойства, характерные для М2.

Убедившись в способности МСК индуцировать переключение М1 в М2 (М1→М2), мы предположили, что аналогичным будет влияние МСК на предшественники макрофагов – моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке. В этой экспериментальной серии МСК, находящиеся во «вкладышах», помещали в лунки, на дне которых находились моноциты периферической крови в М1-индукционной среде, и культивировали в течение 7 сут (ММСК). В качестве контроля использовали М1, генерированные без МСК, и в нескольких экспериментах – М2. Характеристика Мф (М1, М2, ММСК) включала оценку морфологии клеток, экспрессии CD206, способности стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и цитокин-секреторной активности Мф.

Из данных рис. 2, а видно, что в 7-суточных культурах М1 преобладали клетки округлой формы, тогда как в культурах М2 – фибробластопо-

добные клетки (рис. 2, а, с). В культурах ММСК присутствовали клетки обеих форм, однако

большинство клеток имело морфологические черты М1 (рис. 2, а, b).

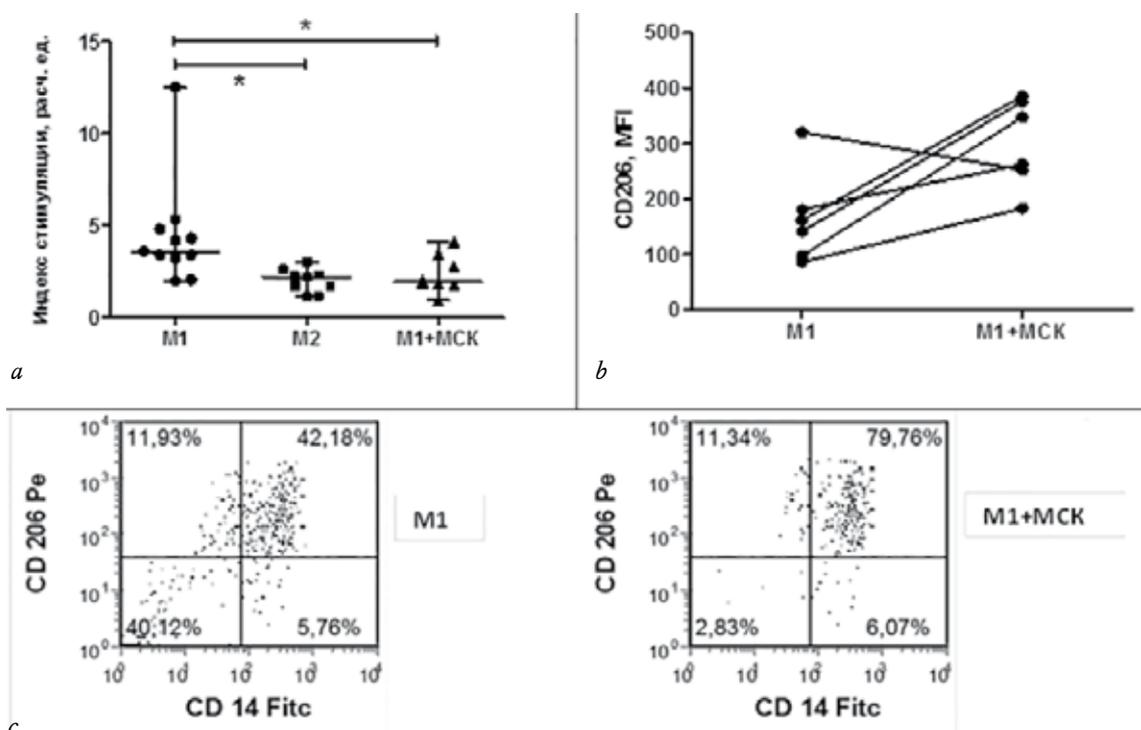


Рис. 1. Сравнительная характеристика макрофагов М1, М1+МСК и М2: *a* – аллостимуляторная активность М1, М1+МСК и М2 в СКЛ. Данные представлены в виде медианных значений и квартильного диапазона индексов стимуляции в СКЛ ($n = 11$). $*p < 0,05$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок; *b* – экспрессия CD206 на М1 и М1, сокультивированных с МСК в течение 48 ч (М1+МСК). Данные представлены в виде индивидуальных значений средней интенсивности флуоресценции (MFI); *c* – представлены индивидуальные DotPlot распределения М1 и М1+МСК макрофагов по флуоресценции FITC-меченных анти-CD14 антител и PE-меченных анти-CD206 антител. Относительное содержание CD206+ CD14+ макрофагов – правый верхний квадрант

Fig. 1. Comparative characteristics of M1, M1+MSC and M2 macrophages: *a* – allostimulatory activity of M1, M1 + MSC and M2 in MLC. Data are presented in the form of median values and the quartile range of stimulation indices in MLC ($n = 11$). $*p < 0.05$ by the Wilcoxon matched pairs test; *b* – expression of CD206 on M1 and M1-, co-cultured with MSC for 48 h (M1 + MSC). The data are presented as individual values of the mean fluorescence intensity (MFI); *c* – individual DotPlot of M1 and M1+MSC macrophages by the fluorescence of FITC-labeled anti-CD14 antibodies and PE-labeled anti-CD206 antibodies are presented. The relative content of CD206 + CD14 + macrophages shown in the right upper quadrant

Анализ экспрессии CD206 на макрофагах, генерированных из моноцитов в присутствии МСК, не выявил ожидаемого увеличения количества CD206-позитивных Мф. Так, видно (рис. 2, b), что интенсивность флуоресценции CD206 в культурах М1 и ММСК значимо не различалась между собой (Me 256 и 237 соответственно), но при этом была достоверно ниже, чем в популяции М2 (Me 399; $p < 0,05$).

В отношении макрофагов, генерированных из моноцитов в присутствии МСК, не было выявлено также характерного для М2 снижения стимуляторной активности в алло-СКЛ. Из данных рис. 2, с видно, что аллостимуляторная активность ММСК была сопоставима с таковой у М1 (ИСМФ

3,45 и 3,4 расч. ед. соответственно) и достоверно превышала значения М2 (ИС 3,45 против 2,2 расч. ед.; $p < 0,05$).

Полученные данные позволяют заключить, что МСК индуцируют М1→М2 в культурах М1, но не проявляют М2-поляризующей активности в отношении моноцитов, стимулированных к М1-дифференцировке.

Оценка способности макрофагов М1 и ММСК секретировать провоспалительные (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12), противовоспалительные (IL1-ra, IL-4, IL-10), иммунорегуляторные (IFN- γ , IL-17) цитокины и хемокины (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin) дополнительно свидетельствует о том, что МСК не оказывают

M2-поляризующего эффекта на моноциты, индуцированные к M1-дифференцировке. Из данных рис. 3 видно, что ММСК значительно не отличались от M1 по уровню продукции исследуемых цитокинов в супернатантах 7-суточных культур. Таким образом, отсутствие снижения продук-

ции провоспалительных и повышения уровня противовоспалительных цитокинов, характеризующих реполяризацию M1→M2, подтверждает, что МСК не оказывают M2-поляризующего действия на моноциты, индуцированные к M1-дифференцировке.

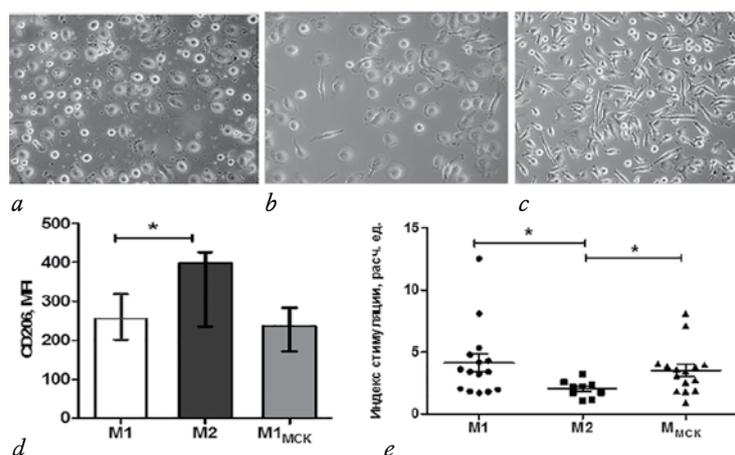


Рис. 2. Сравнительная характеристика макрофагов M1, ММСК и M2: 7-суточные культуры макрофагов M1 (a), ММСК (b) и M2 (c) (нативные препараты, увеличение x250); d – экспрессия CD206 макрофагами M1 и ММСК. Представлены медианные значения и квартильные диапазоны средней интенсивности флуоресценции (MFI; $n = 5$); e – аллостимуляторная активность макрофагов M1, ММСК и M2 в СКЛ. Индексы стимуляции в СКЛ представлены в виде медианных значений и квартильных диапазонов ($n = 15$). * $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона для связанных выборок)

Fig. 2. Comparative characteristics of M1, MMSC and M2 macrophages: a – 7-day cultures of M1 (a), MMSC (b) and M2 (c) macrophages (native the x250); b – expression of CD206 by M1 and MMSC macrophages. Median values and the quartile ranges of the mean fluorescence intensity (MFI; $n = 5$) are presented; c – allostimulatory activity of M1, MMSC and M2 macrophages in MLC. The indices of stimulation in MLC are presented toly median values and the quartile ranges ($n = 15$). * $p < 0.05$ (Wilcoxon matched Pairs Test for coupled samples)

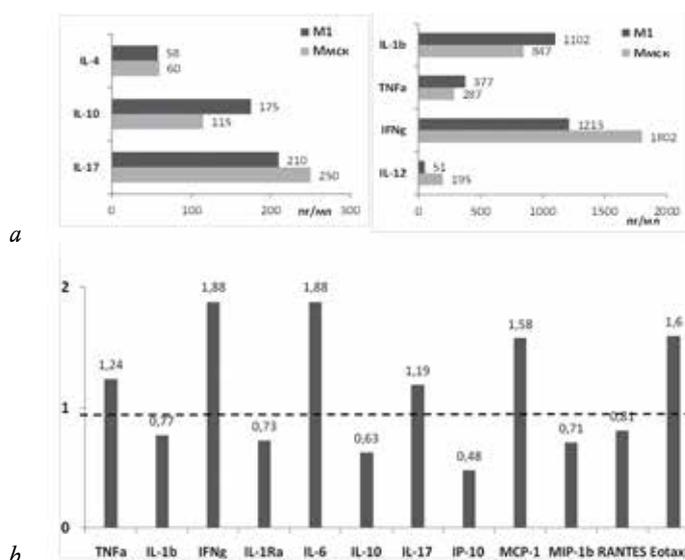


Рис. 3. Цитокин-секреторная активность макрофагов M1 и ММСК: a – уровень продукции противовоспалительных (IL-4, IL-10), IL-17 и провоспалительных (IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-12) цитокинов; b – индексы влияния МСК на продукцию цитокинов (значения >1 свидетельствует о стимуляции продукции, <1 – о снижении продукции).

Fig. 3. Cytokine-secretory activity of M1 and MMSC macrophages: a – the level of production of anti-inflammatory (IL-4, IL-10), IL-17 and pro-inflammatory (IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-12) cytokines; b – Indices of the influence of MSC on the production of cytokines (values > 1 indicates stimulation, <1 – decrease in production)

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что результатом взаимодействия МСК и моноцитов/макрофагов является изменение свойств генерируемых макрофагов, причем направленность этих изменений зависит от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Действительно, даже ограниченное по времени (48 ч) воздействие МСК на уже поляризованные М1 приводит к появлению у последних свойств М2-подобных Мф, в частности сниженной аллостимуляторной активности и повышенной экспрессии CD206. В то же время при длительном (в течение 7 сут) воздействии МСК на моноциты, индуцированные к М1-дифференцировке, генерируется популяция М1-подобных макрофагов, отличающихся высокой аллостимуляторной активностью, характерным для М1 спектром продуцируемых цитокинов и отсутствием повышенной экспрессии CD206.

Полученные результаты частично не укладываются в общепринятую концепцию о способности МСК индуцировать фенотип М2. Во многом эти различия обусловлены разными методическими подходами. Так, в первом сообщении о способности МСК генерировать «новый» тип альтернативно активированных Мф [9] влияние МСК изучалось на популяции так называемых неполяризованных, макрофагах М0, образованных из сепарированных клеток CD14+ в течение 5–7 сут без каких-либо дополнительных стимулов (ростовых факторов). Затем последовали работы с использованием Мф мышей (LPS-стимулированные перитонеальные Мф; M-CSF-стимулированные костномозговые Мф), которые при культивировании в присутствии М1/М2-индуцирующих стимулов и костномозговых мышечных МСК приобретали черты М2 в виде снижения продукции провоспалительных цитокинов и повышения продукции IL-10 [19, 20].

В данном исследовании МСК индуцировали М1→М2 только при взаимодействии с М1, что проявлялось снижением их стимуляторной активности в алло-СКЛ и повышением экспрессии CD206, в то время как в отношении моноцитов, стимулированных к М1-дифференцировке, МСК не проявляли М2-поляризующей активности. Аналогичные результаты были получены А.В. Vasandan с соавт., изучавшими поляризующее влияние МСК на клетки линии моноцитов человека THP-1, которая является общепринятой моделью для изучения дифференцировки и поляризации Мф человека [21]. Авторы показали

зависимость эффекта МСК от стадии дифференцировки отвечающих клеток. Так, при взаимодействии с недифференцированными клетками линии THP-1 (т.е. с моноцитами) и PMA-активированными клетками THP-1 (т.е. с недифференцированными макрофагами М0) МСК проявляли М1-поляризующую активность, усиливая дифференцировку моноцитов и макрофагов М0 в М1. Сокультивирование уже поляризованных М1 с МСК сопровождалось ослаблением М1- и усилением М2-активности Мф, что согласуется с нашими данными о способности МСК изменять функциональный фенотип зрелых, дифференцированных Мф в М1→М2.

Однако эффекты МСК на моноциты периферической крови человека в этой работе не изучались. В тех единичных работах, где оценивалось влияние МСК на моноциты человека, использовались совершенно разные методические подходы (различные дифференцирующие стимулы и сроки культивирования). Так, S.M. Melief с соавт. показали, что добавление МСК к культурам моноцитов, стимулированных IL-4 и GM-CSF, направляет дифференцировку моноцитов в IL-10-продуцирующие Мф [11]. В работе M. Francois с соавт. сокультивирование МСК и моноцитов CD14+ в течение 4 сут приводило к формированию CD206+/IL-10-продуцирующих Мф. Однако в такой экспериментальной системе моноциты культивировались без какого-либо дифференцирующего стимула [12]. Взаимодействие МСК и моноцитов изучали L. Chiossone с соавт., однако в этой работе для дифференцировки моноцитов авторы использовали M-CSF, широко известный индуктор М2-дифференцировки и показали М2-поляризующее влияние МСК в таких условиях [22]. Важным результатом последнего исследования, на наш взгляд, можно считать данные о возможности реполяризации полученных М2 с образованием М1-провоспалительных Мф при стимуляции клеток через Toll-подобные рецепторы (TLRs). Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что если в отношении мезенхимально-макрофагальных взаимодействий можно с полной определенностью говорить о М2-поляризующем эффекте МСК, то в отношении моноцитов такой однозначности в настоящее время не существует. Имеющиеся немногочисленные данные достаточно противоречивы и свидетельствуют о способности МСК направлять дифференцировку моноцитов в макрофаги как фенотипа М1, так и М2.

В завершении следует отметить, что данные о М2-поляризующем влиянии МСК на Мф не могут быть автоматически перенесены и применены к

взаимодействиям МСК – моноциты как минимум по двум причинам. Во-первых, существуют процессы (например, фагоцитоз апоптотических клеток, или эффероцитоз), которые четко свидетельствуют о функциональных различиях моноцитов и Мф. Так, для моноцитов четко показано возрастание LPS-индуцированной продукции IL-10 при инкубации с апоптотическими клетками [23, 24]. В то же время эффект эффероцитоза в культурах неполяризованных макрофагов M0 и M1 не так однозначен: имеются данные об увеличении продукции IL-10 [25, 26], отсутствии изменений [27] и о снижении уровня IL-10 [23, 24, 28]. Во-вторых, вопреки давно устоявшемуся мнению о происхождении всех Мф из моноцитов в костном мозге, сегодня считается, что тканевые резидентные Мф происходят из желточного мешка и функционируют независимо от костного мозга, в то время как циркулирующие Мф дифференцируются и пополняются из пула моноцитов костного мозга [29, 30]. Однако каковы бы ни были взаимоотношения МСК с клетками моноцитарно-макрофагального ряда, можно с уверенностью говорить о способности МСК модулировать реакции врожденного иммунитета, в том числе посредством регуляции процессов дифференцировки моноцитов и переключения макрофагов M1 в M2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение способности МСК индуцировать фенотип M2 моноцитов (макрофагов) выявило зависимость эффекта МСК от стадии дифференцировки отвечающих клеток. При культивировании МСК с моноцитами в M1-индуцирующей среде формируется популяция макрофагов с морфологическими, фенотипическими и функциональными признаками M1. В то же время результатом взаимодействия МСК и поляризованных M1 является генерация M2 с повышенной экспрессией CD206 и сниженной аллостимуляторной активностью.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. – разработка концепции и дизайна; Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Баторов Е.В., Тихонова М.А., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных; Шевела Е.Я., Сахно Л.В. – подготовка текста статьи; Останин А.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 953–964.
- Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 816460. DOI: 10.1155/2015/816460.
- Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P.S., Mayer B., Parmelee A., Doi K., Robey P.G., Leelahavanichkul K., Koller B.H., Brown J.M., Hu X., Jelinek I., Star R.A., Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine.* 2009; 15 (1): 42–49. DOI: 10.1038/nm.1905.
- Ben-Mordechai T., Holbova R., Landa-Rouben N., Har-el-Adar T., Feinberg M.S., Abd Elrahman I., Blum G., Epstein F.H., Silman Z., Cohen S., Leor J. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *Journal of the American College of Cardiology.* 2013; 62 (20): 1890–1901. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.057.
- Gupta N., Su X., Popov B., Lee J.W., Sericov V., Matthay M.A. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* 2007; 179: 1855–1863.
- Braza F., Dirou S., Forest V., Sauzeau V., Hassoun D., Chesné J., Cheminant-Muller M.A., Sagan C., Magnan A., Lemarchand P. Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells.* 2016; 34 (7): 1836–1845 DOI: 10.1002/stem.2344.
- Cheng Z.J., He X.J. Anti-inflammatory effect of stem cells against spinal cord injury via regulating macrophage polarization. *J. Neurorestoratol.* 2017; 5: 31–38. DOI:10.2147/JN.S115696.
- He S., Gleason J., Fik E., DiFiglia A., Bharathan M., Morschauser A., Djuretic I., Xu Y., Krakovsky M., Jankovic V., Buensuceso C., Edinger J., Herzberg U., Hofgartner W., Hariri R. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal-like Cells (PDA-002) Enhance Angiogenesis via T Cell-Dependent Reprogramming of Macrophage Differentiation. *Stem Cells.* 2017; Feb. 24. DOI: 10.1002/stem.2598.
- Kim J., Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology.* 2009; 37 (12): 1445–1453. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.09.004.
- Choi H., Lee R.H., Bazhanov N., Oh J.Y., Prockop D.J. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident mac-

- rophages. *Blood*. 2011; 118 (2): 330–338. DOI: 10.1182/blood-2010-12-327353.
11. Melief S.M., Geutskens S.B., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica*. 2013; 98 (6): 888–895. DOI: 10.3324/haematol.2012.078055.
 12. Francois M., Romieu-Mourez R., Li M., Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*. 2012; 20 (1): 187–195. DOI: 10.1038/mt.2011.189
 13. Melief S.M., Schrama E., Brugman M.H., Tiemessen M.M., Hoogduijn M.J., Fibbe W.E., Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells*. 2013; 31 (9): 1980–1991. DOI: 10.1002/stem.1432.
 14. Sica A., Erreni M., Allavena P., Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol. Life Sci*. 2015; 72 (21): 4111–1126. DOI: 10.1007/s00018-015-1995-y.
 15. Fairweather D., Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2009; 33 (3–4): 222–30. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.09.012.
 16. Li Y., Lee P.Y., Reeves W.H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2010; 58(5):355–64. DOI: 10.1007/s00005-010-0093-y.
 17. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Ya.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cellular Therapy and Transplantation*. 2010; 2 (6). DOI: 10.3205/ctt-2010-en-000080.01).
 18. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand J. Immunol.* 2016; 83 (2): 151–159. DOI: 10.1111/sji.12401.
 19. Maggini J., Mirkin G., Bognanni I., Holmberg J., Piazyn I.M., Nepomnaschy I., Costa H., Cacones C., Raiden S., Vermeulen M., Geffner J.R. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010; 5 (2): e9252. DOI: 10.1371/journal.pone.0009252.
 20. Cho D.I., Kim M.R., Jeong H.Y., Jeong H.C., Jeong M.H., Yoon S.H., Kim Y.S., Ahn Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp. Mol. Med.* 2014; 46: e70. DOI: 10.1038/emm.2013.135.
 21. Vasandan A.B., Jahnavi S., Shashank C., Prasad P., Kumar A., Prasanna S.J. Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38308. DOI: 10.1038/srep38308.
 22. Chiossone L., Conte R., Spaggiari G.M., Serra M., Romai C., Bellora F., Becchetti F., Andaloro A., Moretta L., Bottino C. Mesenchymal stromal cells induce peculiar alternatively activated macrophages capable of dampening both innate and adaptive immune responses. *Stem Cells*. 2016; 34 (7): 1909–1921. DOI: 10.1002/stem.2369.
 23. Byrne A., Reen D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.* 2002; 168 (4): 1968–1977.
 24. Fraser D.A., Laust A.K., Nelson E.L., Tenner A.J. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* 2009; 183 (10): 6175–6185. DOI: 10.4049/jimmunol.0902232.
 25. Chung E.Y., Liu J., Homma Y., Zhang Y., Brendolan A., Saggese M., Han J., Silverstein R., Sella L., Ma X. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*. 2007; 27 (6): 952–964.
 26. Das A., Ganesh K., Khanna S., Sen C.K., Roy S. Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J. Immunol.* 2014; 192 (3): 1120–1129. DOI: 10.4049/jimmunol.1300613.
 27. Kim S., Elkon K.B., Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*. 2004; 21 (5): 643–53.
 28. Xu W., Roos A., Schlagwein N., Woltman A.M., Daha M.R., van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*. 2006; 107 (12): 4930–4937.
 29. Perdiguero E.G., Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat. Immunol.* 2016; 17 (1): 2–8. DOI: 10.1038/ni.3341.
 30. Schulz C., Gomez Perdiguero E., Chorro L., Szabo-Rogers H., Cagnard N., Kierdorf K., Prinz M., Wu B., Jacobsen S.E., Pollard J.W., Frampton J., Liu K.J., Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012; 336 (6077): 86–90. DOI: 10.1126/science.1219179.

Поступила в редакцию 28.04.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Шевела Екатерина Яковлевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Сахно Людмила Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Баторов Егор Васильевич, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия.

(✉) Шевела Екатерина Яковлевна, e-mail: shevelak@mail.ru.

УДК 576.5:576.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-159–166

For citation: Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effects of mesenchymal stromal cells on monocyte differentiation to M1 phenotype and M1/M2 macrophage switching. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 15–166.

Effects of mesenchymal stromal cells on monocyte differentiation to M1 phenotype and M1/M2 macrophage switching

Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI) 14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

ABSTRACT

Objective. Mesenchymal stromal cells (MSCs) promote the differentiation of unprimed macrophages (Mp) or classically activated M1 cells towards alternatively activated, M2 macrophages. The aim of the work was to study the ability of MSC to induce M1→M2 switching by comparing the MSC effects on polarized M1 macrophages and monocytes stimulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to M1 differentiation.

Material and methods. MSC were co-cultured with monocytes for 7 days or M1 macrophages for 48 hours in Transwell system to prevent direct cell-to-cell contacts. To characterize generated Mp, classical M2 marker CD206, allostimulatory activity in a mixed lymphocyte culture (MLC), and the ability to secrete pro-/anti-inflammatory mediators were analyzed.

Results. Co-cultivation of MSCs and M1 macrophages led to the appearance of phenotypic (increased expression of CD206) and functional (decrease in allostimulatory activity) features of M2 phenotype. When MSCs were cultured with monocytes in the M1-inducing medium, generated Mp elicited a pronounced stimulating activity in MLC similar to that of M1 (stimulation index 3.45 and 3.4, $p = 0.46$) and significantly higher than allostimulatory activity of M2 cells (3.45 vs 2.2, $p = 0.03$). In addition, MSCs did not influence the expression of CD206, as well as the production of pro- (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) and anti-inflammatory (IL1-ra, IL-4, IL-10) cytokines, immunoregulatory cytokines (IFN- γ , IL-17) and chemokines (IP-10, MCP-1, MIP-1b, Rantes, Eotaxin).

Conclusions: The ability of MSC to induce the M2 phenotype depends on the stage of differentiation of monocyte/macrophages. MSCs promote M1→M2 switching in cultures of polarized M1 macrophages. In contrast, when MSCs interacted with monocytes in M1-inducing medium, a population of M1-like macrophages is formed with high allostimulatory activity and typical for M1 spectrum of produced cytokines and chemokines.

Key words: Mesenchymal stromal cells, monocytes, macrophages, M1→M2 polarization, cytokines, chemokines.

Received 28.04.2017
Accepted 06.02.2018

Shevela Ekaterina Ya., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Sakhno Ludmila V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Tikhonova Marina A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Batorov Egor V., PhD, Research fellow, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Ostanin Aleksandr A., DM, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Shevela Ekaterina Ya.**, e-mail: shevelak@mail.ru.