

**В.Н. Сахаров**

аспирант, ассистент кафедры патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56 712 440 000, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

**V.N. Sakharov**

post-graduate, assistant of the Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Scopus Author ID: 56 712 440 000, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

## ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИСТЕМОГО ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

## REPROGRAMMING OF SPLENIC MONONUCLEAR PHAGOCYTE PHENOTYPE DURING MODELING OF SYSTEMIC JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS IN WISTAR RATS

**КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

**Сахаров Владимир Николаевич**, аспирант, ассистент кафедры патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56 712 440 000; Адрес: 119 991, РФ, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. Тел.: 8(968)004-69-11; e-mail: vladimirsah91@mail.ru  
**Статья поступила:** 17.09.2017  
**Статья принята:** 29.09.2017

**CONTACT INFORMATION**

**Sakharov Vladimir Nikolaevich**, post-graduate, assistant of the Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Scopus Author ID: 56 712 440 000; Address: 119 991, Russia, Moscow, Trubetskaya st., 8–2. Tel.: 8(968)004-69-11; e-mail: vladimirsah91@mail.ru  
**Article submitted:** 17.09.2017  
**Article approved:** 29.09.2017

**Аннотация**

**Цель.** Исследование посвящено определению количества альтернативно-активированных (M2, CD163+) макрофагов и других мононуклеарных фагоцитов в селезенке на модели системного ювенильного артрита у крыс линии Wistar, а также в условиях действия дексаметазона и доксицилина. **Методика.** Клеточный фенотип оценивался методом проточной цитофлуориметрии. Доля классически-активированных фагоцитов рассчитывалась (M1, CD163-). **Результаты.** Оценены индексы доминирующего фенотипа фагоцитов в тканях (статистически недостоверное различие). В сравнении показаны изменения индексов мононуклеарных фагоцитов крови (выявлены достоверные изменения). Тем не менее в тканях продемонстрированы фенотипические изменения популяции фагоцитов в целом. **Выводы.** Обнаружено, что именно изменение соотношения альтернативно-активированных клеток из популяций фагоцитов селезенки было достоверно значимо различно в группах животных с применением доксицилина и дексаметазона.

**Ключевые слова:** системная форма ювенильного идиопатического артрита, мононуклеарные фагоциты, моноциты, макрофаги, фенотип.

**Финансирование:** Работа выполнена при федеральной бюджетной поддержке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский

**Abstract**

**Purpose.** This study is devoted to the evaluation of the number of splenic alternatively activated (M2, CD163+) macrophages and other mononuclear phagocytes after arthritis development in a model of systemic juvenile arthritis in Wistar rats (with and without modification by doxycycline or dexamethasone). **Methods.** Cell phenotypes were assessed by flow cytometric analysis. Percentages of classically-activated phagocytes were estimated (M1, CD163-). **Results.** The indexes of dominating phenotypes are assessed for spleen (no significant differences in animal groups). In comparison we demonstrate indexes for the blood mononuclear phagocytes (significant changes were observed). Nevertheless, we have demonstrated phenotypical changes of splenic phagocyte population at whole. **Conclusions.** Redistribution of the tissue alternatively-activated cells of phagocyte population in spleen was found to be significantly different in animal groups with doxycycline and dexamethasone administration.

**Keywords:** the systemic form of juvenile idiopathic arthritis, mononuclear phagocytes, monocytes, macrophages, phenotype.

**Funding:** the work has federal budgetary support of FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University) which provides post-graduate training courses.

Университет), реализующего программы подготовки в аспирантуре.

**Конфликт интересов:** нет конфликта интересов

**Благодарности:** научному руководителю, профессору Литвицкому П.Ф. (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)); Маянскому Н.А. и Закирову Р.Ш. (ФГАУ «ННПЦЗД» Минздрава России) за проведение проточной цитофлуориметрии образцов.

**Conflict of interest:** none declared.

**Acknowledgments:** to scientific supervisor, prof. Litvitskiy P.F. (FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University)); to Mayansky N.A. and Zakirov R.S. (NSPCCH) who performed flow cytometric analysis of the samples.

Диагностика и лечение системной формы ювенильного идиопатического артрита (сЮИА) — актуальная проблема современной медицины. Важность вопроса подчеркивается тем, что среди осложнений сЮИА описано и такое тяжелое состояние, как синдром активации макрофагов, потенциально чреватый гибелью пациента.

Ранее нами была разработана авторская модель сЮИА у крыс линии Wistar [1, 2], которая патогенетически максимально приближена к сЮИА у человека (модель сочетает аутоиммунный компонент с воздействием стимулятора M1-макрофагов липополисахарида ЛПС).

Оценка популяции фагоцитарных клеток селезенки позволит пролить свет на системный компонент иммунопатологической реакции, создаваемой в модели, а также соотнести системные изменения в крови с таковыми в тканях животных.

Таким образом, задачей настоящего исследования стало определение количества альтернативно-активированных (M2, CD163+) макрофагов и других мононуклеарных фагоцитов в селезенке после воспроизведения артрита на модели системного ювенильного артрита у крыс линии Wistar (в т. ч. при действии дексаметазона и доксицилина).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Модель сЮИА** [1, 2] адаптировали у 24 крыс Wistar (самцы, 6 месяцев). Если кратко, использовано двукратное введение полного адьюванта Фрейнда — внутрикожные многоточечные инъекции адьюванта (1 мг/мл, Sigma Aldrich, USA) на 0 и 40-е сутки по 0,5 мл — и трехкратное (в возрастающих согласно формуле изобретения количествах на 0, 18 и 40-е сутки) липополисахарида (Медгамал, Россия). На 40-е сутки все крысы были разделены на три группы (дополнительно вводились следующие препараты): в 1-й группе (контроль) — подкожное введение 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия (Борисовский завод медицинских препаратов, Бо-

рисов, Беларусь), во 2-й группе — подкожное введение 50 мг/кг доксицилина (Саратов, Россия), в 3-й группе — подкожное введение 4 мг/кг дексаметазона, (KRKA, Словения). Такие же количества модифицирующих веществ и физраствора ввели повторно на 54-е сутки исследования. Изъятие селезенки производилось в завершении эксперимента (57-е сутки). Ему предшествовало взятие образцов крови на 0, 21, 41 и 55-е сутки.

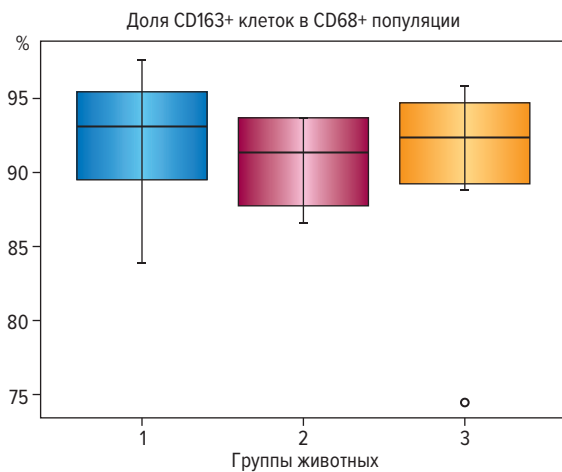
**Подготовку проб** тканей селезенки проводили путем их гомогенизации и обработки коллагеназой; выделение мононуклеаров периферической крови — гравиметрически. Пробы анализировались на проточном цитометре Cell Analyzer BD FACSCanto II (USA). Использованы антитела: FITC Mouse Anti-Rat CD11b FC WT.5 (RUO) (BD Pharmingen™); anti-rat CD68 RPE (MCA341PE), Serotec, Kidlington, UK; anti-rat CD163 ALEXA FLUOR® 647 (MCA342A647), Serotec, Kidlington, UK. Процедуры проводились в соответствии с инструкциями производителей.

**Интерпретация окрашивания клеток из образцов тканей селезенки:** CD68 рассматривался как маркер мононуклеарных фагоцитов, при этом популяция CD11b-CD68+ считалась резидентными макрофагами, а популяция CD68+CD11b+ рассматривалась как гетерогенная популяция, состоящая из других мононуклеарных фагоцитов, в т. ч. привлеченных в ткань моноцитов, моноцитов, дифференцирующихся в макрофаги, и дендритных клеток.

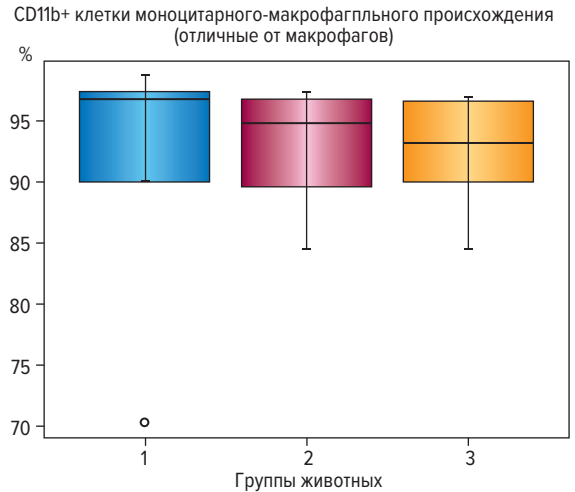
**Интерпретация окрашивания клеток из образцов периферической крови:** CD11b+CD68+ рассматривалась как моноциты, а CD11b-CD68+ как циркулирующие дендритные клетки.

В качестве **маркера альтернативной (M2) активации** мононуклеарных фагоцитов использовался CD163. Доля **классически-активированных фагоцитов** рассчитывалась (M1, CD163-).

**Оценка достоверности** различия показателей проводилась с использованием программного обеспечения R [3] путем проведения теста Mann—Whitney—Wilcoxon. Достоверными считались изменения с ошибкой  $p < 0,05$ .



**РИС. 1.** Доля (в %) альтернативно-активированных (CD163+) клеток среди популяции CD68+ клеток селезенки при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Группы животных: 1 (контроль), 2 (доксциклин), 3 (дексаметазон)



**РИС. 2.** Доля CD11b+ клеток среди CD68+ популяции селезенки (моноклеточные фагоциты, отличные от макрофагов) при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Группы животных: 1 (контроль), 2 (доксциклин), 3 (дексаметазон)

На рисунках представлены диаграммы размаха для изученных показателей (черная горизонтальная линия — медиана, ящики ограничены 25-м и 75-м перцентилями (Q1 и Q3 соответственно), верхняя граница соответствует  $Q3 + 1,5*(Q3-Q1)$ , нижняя граница соответствует  $Q1 - 1,5*(Q3-Q1)$ ). Отдельными точками отмечены выбросы. Необходимо обратить внимание, что некоторые статистические приложения (среди которых и R) при формировании ящиков определяют не непосредственно квартили 1 и 3, а медианы верхней и нижней половин данных [4], которые могут несколько отличаться от квартилей, в частности, в зависимости от того, четные или нечетные показатели.

**Доля CD11b+ клеток среди CD68+ популяции клеток селезенки (моноклеточные фагоциты, отличные от резидентных макрофагов) при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar**

Обращает на себя внимание тот факт, что несмотря на несколько различающееся распределение показателей (рис. 2), различий в процентном содержании среди CD68+ клеток селезенки, несущих также моноклеточный маркер CD11b, среди групп животных не было ( $p > 0,05$ ). Т. е. достоверных изменений структуры популяции CD68+ клеток селезенки по маркеру CD11b (без учета активации клеток) не было.

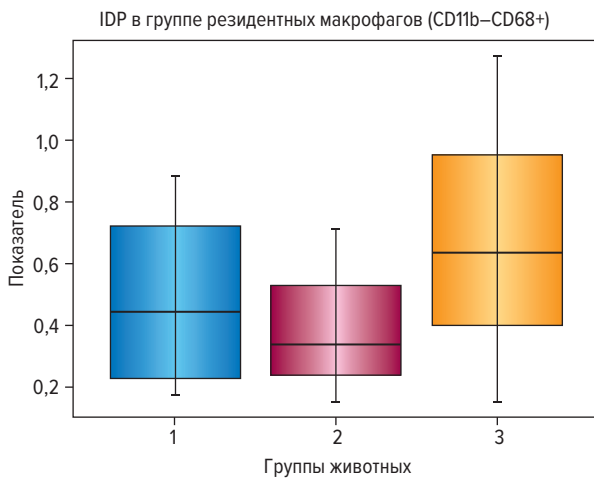
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

**Доля альтернативно-активированных (CD163+) клеток среди CD68+ популяции клеток селезенки при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar**

Достоверных различий между долями CD163+ клеток среди совокупности клеток селезенки моноклеточно-макрофагального происхождения, определяемых по положительной реакции на внутриклеточный маркер CD68, среди групп животных не выявлено ( $p > 0,05$ ) (рис. 1). Это позволяет предположить, что в патогенезе модельного заболевания играют роль не фагоциты вместе взятые (CD68+), а отдельные их подгруппы или даже изменение соотношения между подгруппами. Указанное предположение далее будет подкреплено соответствующими результатами.

**Индекс доминирующего фенотипа в группе резидентных макрофагов (CD11b-CD68+)**

Ранее был предложен алгоритм оценки системы активации макрофагов (Сахаров В.Н, Литвицкий П.Ф., 2016) [5], который в т. ч. основан на расчете индекса доминирующего фенотипа (IDP). В случае с резидентными макрофагами индекс определялся как соотношение  $CD11b-CD68+CD163- / CD11b-CD68+CD163+$ . Достоверных различий показателей между группами животных (рис. 3) выявлено не было, что тем не менее может быть связано с ограничением срока изъятия селезенки у животных 57 сутками (анализ тканей в нескольких временных точках до полноценной реализации модели, что потребовало бы увеличения числа групп, учитывая поисковый характер данной части исследования, не соответствовал бы требованию минимально необходимого использования животных в лабораторной практике). К тому же



**РИС. 3.** Индексы доминирующего фенотипа резидентных макрофагов (CD11b-CD68+) при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Группы животных: 1 (контроль), 2 (доксциклин), 3 (дексаметазон)

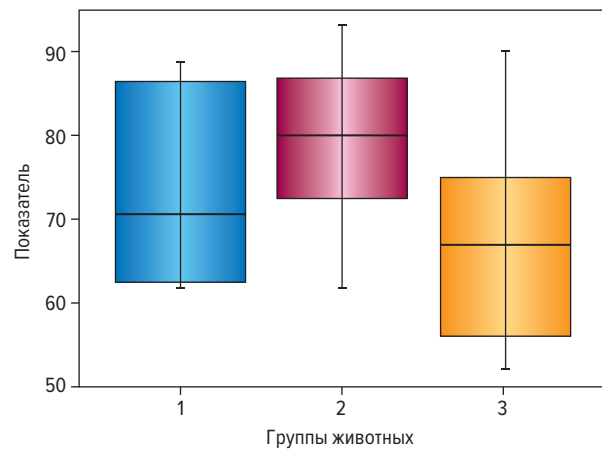
различия, достигнутые между группами доксициклина (группа 2) и дексаметазона (группа 3), на 57-е сутки имеют ошибку всего в 8 % ( $p = 0,08199$ ). Теперь актуальность исследования динамики данного показателя макрофагов и на протяжении реализации модели подтверждена наличием близкого к достоверному различия данных. Тем не менее дизайн исследования позволил проанализировать динамику индексов доминирующего фенотипа по результатам оценки клеток периферической крови.

**Соотношение макрофагов и иных мононуклеарных фагоцитов, подвергшихся альтернативной активации в ткани селезенки**

С учетом вышеприведенных данных оценка структуры альтернативно-активированных фагоцитов представлялась наиболее актуальной. Для этого определено соотношение резидентных макрофагов и иных мононуклеарных фагоцитов (отношение CD11b-CD68+CD163+/CD11b+CD68+CD163+) (рис. 4).

Итак, на момент окончания эксперимента (57-е сутки) среди альтернативно-активированных клеток в селезенке в группе доксициклина (в сравнении с группой дексаметазона) соотношение макрофаги/иные фагоциты было достоверно большим ( $p = 0,04988$ ). Таким образом, учитывая, что проявления местных воспалительных изменений в группе дексаметазона также были достоверно ниже, чем в группе доксициклина [6], можно говорить о значимой роли в патогенезе заболевания именно перераспределения численностей популяций моноцитарно-макрофагального происхождения в тканях. В частно-

Соотношение макрофагов и иных мононуклеарных фагоцитов, подвергшихся альтернативной активации в ткани селезенки



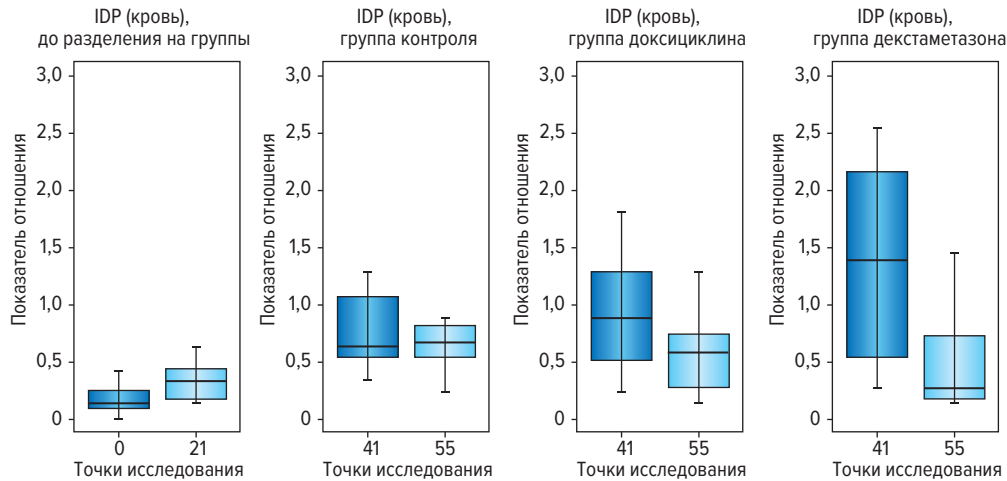
**РИС. 4.** Соотношение макрофагов и иных мононуклеарных фагоцитов, подвергшихся альтернативной активации в ткани селезенки при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Группы животных: 1 (контроль), 2 (доксциклин), 3 (дексаметазон)

сти, можно говорить, что увеличение преобладания альтернативно-активированных макрофагов CD11b-CD68+ над остальными альтернативно-активированными мононуклеарными фагоцитами сопровождалось большей выраженностью воспалительных проявлений. Также обращает на себя внимание тот факт, что в группе контроля больше размах между 25 и 75 перцентильями, а применение доксициклина и дексаметазона привело к разнонаправленному смещению распределения показателей.

Более того, применение дексаметазона привело к достоверному уменьшению (в сравнении с доксициклином) указанного соотношения, это позволяет предположить, что существенная роль в патогенезе модельного заболевания отведена именно группе CD11b-CD68+CD163+ клеток, которая (как отмечалось ранее) может быть весьма разнородной, в т. ч. может включать привлеченные в ткань моноциты. Таким образом, в данном исследовании альтернативная активация именно CD68+ клеток, несущих на себе еще и моноцитарный маркер CD11b, оказалась более «эффективной». Представленные данные показывают, что эффекты популяции тканевых клеток CD68+ (которые зачастую приравниваются к макрофагам) могут реализовываться субпопуляциями этой группы с разной эффективностью.

**Индекс доминирующего фенотипа мононуклеарных клеток периферической крови (отношение CD68+CD163-/CD68+CD163+)**

При моделировании сЮИА у крыс на 21-е сутки отмечены достоверно большие значения IDP



**РИС. 5.** Динамика изменения индекса доминирующего фенотипа (отношение числа клеток CD68+CD163-/CD68+CD163+) в периферической крови при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar в группах животных

(по сравнению с 0,  $p = 0,003498$ ), повышенные значения сохранялись на протяжении исследования (значения 41 и 55 суток по сравнению с исходными,  $p < 0,05$ ). Однако на 55-е сутки только в группе контроля показатели достоверно выше по сравнению с 21-ми сутками (рассматривается как первичный ответ, т. к. еще не произошло повторной стимуляции иммунной системы одновременным введением адьюванта и ЛПС,  $p = 0,003127$ ), в группах же доксициклина и дексаметазона показатель 55 суток не отличается достоверно от первичного ответа, зарегистрированного на 21-е сутки ( $p = 0,06738$ ,  $p = 0,5565$  соответственно). Обращает на себя внимание, что на 41-е сутки наибольшее медианное значение индекса (1,41) в группе дексаметазона (недостоверно), а к 55-м суткам (по сравнению с 41) показатели индекса уменьшаются ( $p = 0,03906$ ).

Различия динамики изменения индекса под влиянием модифицирующих препаратов и в контроле подтверждают гипотезу, легшую в основу алгоритма оценки активации макрофагов [5]. Однако в связи с полученной в исследовании информацией необходимо добавить, что исследованные препараты, как, очевидно, и другие, не являются строгими активаторами только M1 или M2 звеньев, а напротив, включают целый профиль воздействий, зависящий от подгруппы клеток и ее вклада в развитие воспалительного процесса.

Уместно предполагать, что, зная профиль препарата, профиль патогенеза конкретного заболевания (перечень иммунологических сдвигов на фоне развития заболевания), степень важности каждого компонента в патогенезе и степень влияния препарата на каждый компонент, можно расчетным путем оценить вероятность успеха применения препарата при конкретном заболевании (по аналогии, например, с расчетом биологической дозы облучения на основе точных коэффициентов пересчета).

## ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При моделировании сЮИА среди групп крыс достоверно не различались доли альтернативно-активированных CD68+ фагоцитов селезенки; структура популяции CD68+ фагоцитов селезенки (разделение проводилось по дополнительному маркеру CD11b); индексы доминирующего фенотипа для резидентных макрофагов (CD11b-CD68+CD163-/CD11b-CD68+CD163+) селезенки.
2. Увеличение преобладания альтернативно-активированных макрофагов CD11b-CD68+ над остальными альтернативно-активированными мононуклеарными фагоцитами (отмеченное в группе доксициклина) сопровождалось большей выраженностью воспалительных проявлений, т. е. в патогенезе модельного заболевания достоверно различалась именно структура популяции альтернативно-активированных фагоцитов.
3. Динамика изменения индексов доминирующего фенотипа для мононуклеаров периферической крови различна в группах модифицирующих препаратов и группе контроля. В частности, к концу исследования (55-е сутки) повышение роли M1 ответа в группе контроля оставалось более выраженным (по сравнению с 21-ми сутками), а в группах модифицирующих препаратов не отличалось от такового 21 суток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Litvitskiy P, Sakharov V, Alexeeva E, et al. THU0212 Model of Arthritis with The Typical Systemic Manifestations in Wistar Rats. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016; 75:264.
2. Литвицкий П.Ф., Сахаров В.Н., Алексеева Е.И., Маянский Н.А. Способ создания биологической модели си-



стемного ювенильного идиопатического артрита в эксперименте. Патент RU 2 612 843 C1. Заявка от 18.02.2016. Дата регистрации 13.03.2017.

[Litvitskij P.F., Sakharov V.N., Alekseeva E.I., Mayanskij N.A. Method for creation biological model of systemic juvenile idiopathic arthritis in experiment. Invention patent RU 2 612 843 C1. Application 18.02.2016. Registration date 13.03.2017]

3. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
4. Krzywinski M., Altman N. Points of significance: Visualizing samples with box plots. *Nat Methods*. 2014; 11(2): 119–20 URL: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v11/n2/full/nmeth.2813.html> (дата обращения: 26.05.2016)
5. Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф. Алгоритм оценки процесса активации макрофагов с целью определения прогноза течения и эффективности лечения заболеваний человека. *Вестник РАМН*. 2015; 70(4): 493–498  
[Sakharov V.N., Litvitskiy P.F. Algorithm of macrophage activation assesment for forecasting and evaluation of treatment effectiveness of human diseases. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2015; 70(4): 493–498.] (In Russian)
6. Litvitskiy P., Sakharov V., Alexeeva E., Mayansky N., Zakirov R. AB0105 Doxycycline and dexamethasone-induced reprogramming of peripheral blood mononuclear cells in a model of arthritis with the systemic manifestations in Wistar rats. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2017; 76(Suppl.2):1082–1083 doi: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3996