

УДК 678.01:543.9:612.017.1
DOI: 10.17223/24135542/24/5

Е. Шаповалова¹, Е.Э. Иванюк^{1,2}, Л.В. Домрачева¹

¹ *Национальный исследовательский Томский государственный университет
(Томск, Россия)*

² *НИИ онкологии Томского НИМЦ (Томск, Россия)*

Влияние полимерных биоразлагаемых материалов на клеточно опосредованный иммунный ответ

Исследовано влияние моноцитарных макрофагов индивидуальных доноров человека на материалы на основе гидроксиапатита и сополимера лактида и гликолида. Моноцитарные макрофаги выделяли методом магнитной сепарации из лейкотромбослоя индивидуальных доноров и культивировали на поверхности материалов в течение 20 дней. Обнаружено, что секреция TNF- α , IL-6 и IL-1 β макрофагами в присутствии материалов не превышает контрольного уровня, следовательно, они не вызывают хронического воспалительного ответа. Скаффолды незначительно влияют на стимуляцию TNF- α и IL-1 β макрофагами от всех трех доноров, но секреция IL-6 указывает на донор-специфический ответ. При длительном культивировании наблюдается высокая концентрация IL-8, что можно объяснить не только его провоспалительным эффектом, но также его свойствами вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии в местах имплантации материала.

Ключевые слова: макрофаги, скаффолды, воспаление, ответ, цитокины

Введение

Роль макрофагов в обеспечении тканевого гомеостаза и физиологического ремоделирования существенна и определяется их способностью приобретать M1 или M2 иммунофенотипы в ответ на различные медиаторы [1]. Преобладание провоспалительной активности макрофагов приводит к формированию хронического воспаления. Обладая пластичными свойствами, макрофаги способны влиять как на интегративные процессы в тканях, так и на их разрушение. M1 субпопуляция макрофагов относится к воспалительному типу и первой обнаруживается в участке повреждения. M1 макрофаги активируются бактериальными липополисахаридами и IFN- γ , а также экспрессируют высокие уровни CCR7, индуцибельную форму NO-синтазы, HLA-DR и ряд провоспалительных цитокинов – TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-12 [2]. M1 субпопуляция макрофагов является ответственной за клеточную пролиферацию в очаге воспаления, тем самым обеспечивается дальнейший процесс репарации. Альтернативно активированные M2 макрофаги преобладают во второй фазе воспаления в условиях воздействия IL-4. Противовоспалительная активность данной субпопуляции отвечает за тканевое ремоделирование и обеспечивается экспрессией

CD206, Ym1, CD163, CCL1, CCL18, FIZZ1, Arg1 и ChT [3]. Кроме того, показано, что макрофаги могут приобрести M2a фенотип посредством секреции IL-4 и IL-13, характеризующийся экспрессией низких уровней ко-стимуляторных молекул и повышением секреции VEGF. В совокупности все эти факторы, секретлируемые M2a субпопуляцией макрофагов, обеспечивают профиброгический и ранозаживляющий эффект [4].

Воспаление, как острое, так и хроническое, является основной клинической проблемой при применении имплантируемых материалов. И в этом случае ключевыми клетками, которые могут как стимулировать, так и подавлять воспалительные реакции в микроокружении имплантата, являются тканевые макрофаги. По реакции макрофагов на материалы имплантата можно сделать вывод об отторжении или принятии имплантата организмом пациента, чтобы предсказать реакцию иммунной системы.

Цель настоящей работы – исследование влияния моноцитарных макрофагов индивидуальных доноров человека на материалы на основе гидроксиапатита и сополимера лактида и гликолида.

Экспериментальная часть

В соответствии с разработанной нами модельной системой были исследованы реакции первичных человеческих макрофагов на материалы на основе гидроксиапатита и сополимера лактида и гликолида. Каркасы изготовлены на основе полилактид-ко-гликолида (PLGA; соотношение лактида и гликолида = 80/20) и керамического наполнителя (Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). В качестве основных параметров, характеризующих провоспалительный ответ макрофагов, были выбраны ключевые цитокины M1 макрофагов: TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8. Моноцитарные макрофаги выделяли методом магнитной сепарации из лейкоцитомблосля индивидуальных доноров и культивировали на поверхности материалов в течение 20 дней. Для достижения условий, наиболее приближенных к среде живого организма, и наибольшей выживаемости клеток клетки ресуспендировали в клеточной среде X-VIVO (Lonza, США) с добавлением дексаметазона (Sigma Aldrich) 1×10^{-8} М и M-CSF (Sigma Aldrich) в концентрации 1 нг/мл [5]. В каждую лунку с образцом добавляли 2 мл суспензии макрофагов в концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл (всего 2×10^6 клеток). В качестве контроля исследовали клетки, культивированные на пластике без образцов модельных каркасов. Клетки инкубировали при 37°C и 7,5% CO_2 .

Результаты и обсуждение

Альтернативой классическим материалам для трансплантологии являются биомедицинские клеточные и тканеинженерные продукты для замещения тканей и органов. Применение скаффолдов обеспечивает эффективное взаимодействие между тремя компонентами: самим каркасом (отвеча-

ет за пространственное расположение клеток), клетками, которые образуют новую ткань на каркасе, и сигнальными молекулами (факторы роста, направляющие процесс дифференцировки клеток). Отсутствие воспаления и аллергических реакций иммунной системы способствует успешной интеграции скаффолда. Первостепенное значение среди клеток иммунной системы отводится макрофагам, благодаря их высокой пластичности и способности переключать фенотип в зависимости от внешних факторов. В качестве основных параметров, характеризующих провоспалительный ответ макрофагов, в настоящей работе были выбраны ключевые цитокины M1 макрофагов: TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8. На рис. 1 показан анализ экспрессии IL1 β при разной длительности культивирования. Выявлено, что в первые три дня после начала инкубации концентрация цитокина при культивировании донорских клеток 1 и 2 на поверхности образцов выше, чем при нанесении клеток на пластик. Но при длительном культивировании концентрация изучаемого цитокина снижается, что свидетельствует о снижении провоспалительного действия каркасов.

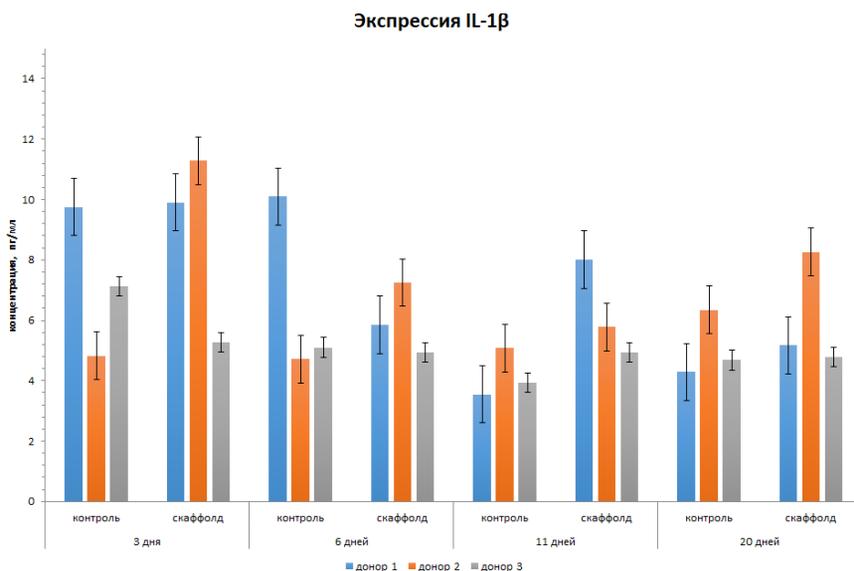


Рис. 1. Анализ экспрессии IL1 β при разной длительности культивирования макрофагов

На рис. 2 продемонстрированы данные секреции IL-6 при разной длительности культивирования. Анализ экспрессии указывает на специфичную для донора реакцию макрофагов на образцы каркаса: у доноров 2 и 3 каркас не стимулирует повышенную секрецию IL-6, т.е. не вызывает провоспалительного эффекта.

Исследование секреции IL-8 в разных временных промежутках показано на рис. 3. Нами продемонстрировано, что при длительном культивировании данный цитокин экспрессируется при нанесении клеток как на пластик, так и на поверхности каркасов.

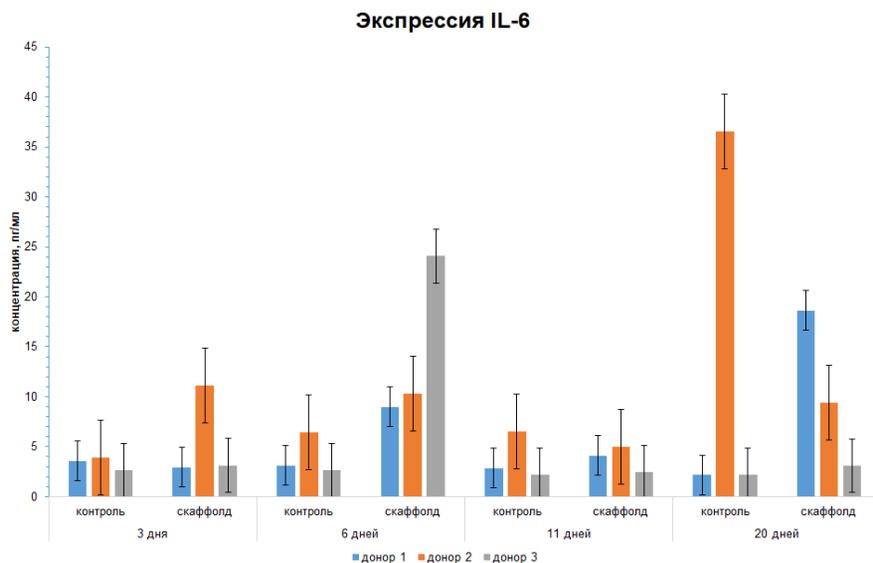


Рис. 2. Анализ экспрессии IL-6 при разной длительности культивирования макрофагов

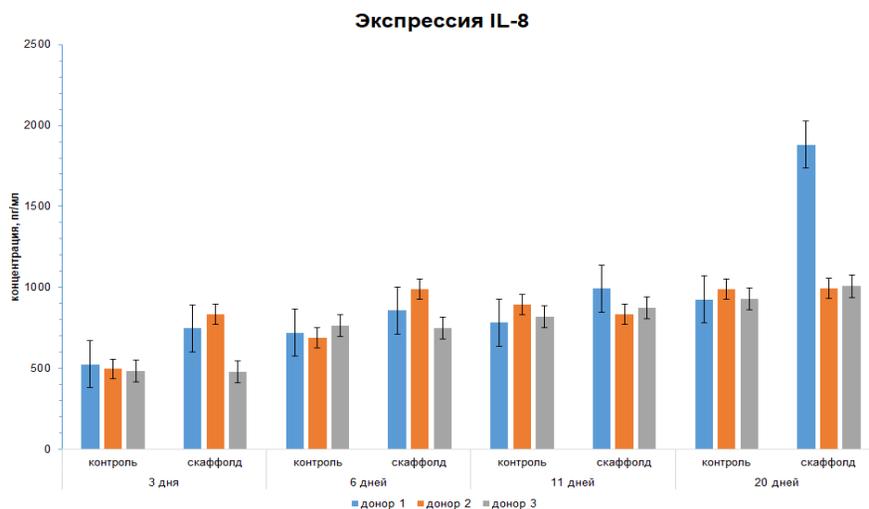


Рис. 3. Анализ экспрессии IL-8 при разной длительности культивирования макрофагов

В первые дни после начала культивирования повышенная экспрессия IL-8 объясняется острой воспалительной реакцией, но образцы каркасов стимулируют секрецию цитокинов на уровне, сопоставимом с контрольными клетками. При длительном культивировании высокая концентрация IL-8 может быть объяснена его свойствами вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии в местах имплантации материала. Из литературы известно, что присутствие тканеинженерного матрикса потенциально

способно изменять соотношение M1 и M2 субпопуляций макрофагов в ту или иную сторону. Продолжительное присутствие M1 макрофагов может вести к обширному воспалению и формированию фиброзной капсулы вокруг материала. В результате в месте имплантации формируется хроническое воспаление, что в конечном счете может привести к отторжению имплантата и необходимости его извлечения [6]. Длительное присутствие M2 макрофагов также может приводить к отрицательным последствиям, таким как появление гигантских клеток и макрофагов, находящихся в состоянии фрустрированного фагоцитоза, вызванного невозможностью деградировать чужеродное тело [7]. Нами установлено, что секреция TNF- α , IL-6, IL-1 β при культивировании первичных макрофагов на поверхности исследуемого полимерного материала не превышает уровня здоровых доноров в сыворотке крови, т.е. не вызывает хронической воспалительной реакции (рис. 4).

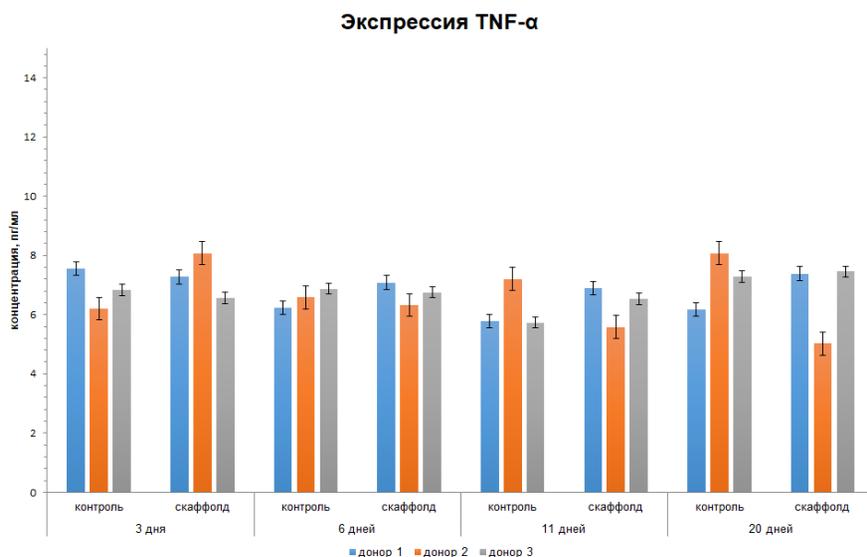


Рис. 4. Анализ экспрессии TNF- α при разной длительности культивирования макрофагов

Гидроксиапатит является основной минеральной составляющей кости и широко применяется в биомедицине в связи с хорошей биосовместимостью и биодоступностью. Матрицы на основе гидроксиапатита с соответствующей структурой, биоразлагаемостью и механическими свойствами способны инициировать адгезию, пролиферацию и дифференцировку остеобластов [8]. Рядом научных групп показано, что совместное культивирование макрофагальной линии RAW264.7 мышей с гидроксиапатитовыми покрытиями HA-10Ce и HA-30Ce приводило к изменению экспрессионного профиля макрофагов в сторону M2 фенотипа и характеризовалось повышением экспрессии поверхностных маркеров CD163 и CD206,

генов, ответственных за остеобластогенез (BMP2 и TGF- β 1), а также увеличением продукции противовоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6. При этом наблюдалось подавление маркеров M1 субпопуляции макрофагов (CCR7 и CD11c), снижение провоспалительных цитокинов (IL-10 и IL-1ra) и активных форма кислорода [9]. В нашей работе продемонстрировано, что каркасы существенно не влияют на стимуляцию TNF- α и IL-1 β макрофагами всех трех доноров, но секреция IL-6 является специфичной для донора реакцией. При длительном культивировании наблюдается высокая концентрация IL-8, что можно объяснить не только его провоспалительным действием, но и его особенностями вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии в местах имплантации материала.

Выводы

В ходе выполнения настоящей работы продемонстрировано, что скаффолды незначительно влияют на стимуляцию TNF- α и IL-1 β макрофагами от всех трех доноров, но секреция IL-6 указывает на донор-специфический ответ. При длительном культивировании наблюдается высокая концентрация IL-8, что можно объяснить не только его провоспалительным эффектом, но также его свойствами вызывать миграцию клеток и способствовать их адгезии в местах имплантации материала.

Литература

1. Abumaree M.H., Jumah M.A., Kalionis B. Human placental mesenchymal stem cells (pMSC) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages // *Stem Cell Rev.* 2013. № 9 (5). P. 620–641.
2. Luz-Crawford P., Djouad F., Toupet K. Mesenchymal stem cell-derived IL1RA promotes macrophage polarization and inhibits B cell differentiation // *Stem Cells.* 2016. № 34 (2). P. 483–492.
3. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration // *Immunobiology.* 2014. № 219 (3). P. 172–178.
4. Novak M.L., Koh T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair // *J Leukoc Biol.* 2013. Vol. 93 (6). P. 875–881.
5. Popova A., Kzhyshkowska J., Nurgazieva D., Goerdт S. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation // *Immunobiology.* 2010. № 216 (1-2). P. 164–172.
6. Sridharan R., Cameron A.R., Kelly D.J. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles // *Materials Today.* 2015. № 18. P. 313–325.
7. Akilbekova D., Philip R., Graham A., Bratlie K.M. Macrophage reprogramming: influence of latex beads with various functional groups on macrophage phenotype and phagocytic uptake in vitro // *J Biomed Mater Res.* 2015. № 103 (1). P. 262–268.
8. Anselmo A.C., Zhang M., Kumar S. Elasticity of nanoparticles influences their blood circulation, phagocytosis, endocytosis, and targeting // *ACS Nano.* 2015. Vol. 9 (3). P. 3169–3177.
9. Bygd H.C., Forsmark K.D., Bratlie K.M. Altering in vivo macrophage responses with modified polymer properties // *Biomaterials.* 2015. № 56. P. 187–197.

Информация об авторах:

Шаповалова Елена, специалист по учебно-методической работе, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия). E-mail: elenas6691@gmail.com

Иванюк Елена Эдуардовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, НИИ онкологии Томского НИМЦ, старший научный сотрудник, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия). E-mail: elenakremeg@yandex.ru

Домрачева Любовь Васильевна, инженер, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия). E-mail: lvdomracheva42@gmail.com

Tomsk State University Journal of Chemistry, 2021, 24, 49–56. DOI: 10.17223/24135542/24/5

E. Shapovalova¹, E.E. Ivanyuk^{1,2}, L.V. Domracheva¹

¹ *National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia)*

² *Research Institute of Oncology (Tomsk, Russia)*

The effect of polymeric biodegradable materials on the cell-mediated immune response

The effect of monocytic macrophages of human donors on materials based on hydroxyapatite and lactide and glycolide copolymers has been studied. Monocytic macrophages were isolated by magnetic separation from the buffy coats of individual donors and cultured on the surface of materials for 20 days. It was found that secretion of TNF- α , IL-6, and IL-1 β by macrophages in presence of materials does not exceed the control level, therefore, it does not cause a chronic inflammatory response. Scaffolds have insignificantly affected the stimulation of TNF- α and IL-1 β by macrophages from all the three donors, but secretion of IL-6 gives a donor-specific response. With long-term cultivation, there is a high concentration of IL-8, which can be explained not only by its pro-inflammatory effect, but also by its properties to cause cell migration and promote its adhesion at the sites of material implantation.

Keywords: *macrophages, scaffolds, inflammation, response, cytokines*

References

1. Abumaree, M.H.; Jumah, M.A.; Kalionis B. Human placental mesenchymal stem cells (pMSC) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev.*, 2013, 9(5), 620–641.
2. Luz-Crawford, P.; Djouad, F.; Toupet, K. Mesenchymal stem cell-derived IL1RA promotes macrophage polarization and inhibits B cell differentiation. *Stem Cells*, 2016, 34(2), 483–492.
3. Chazaud, B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*, 2014, 219 (3), 172–178.
4. Novak, M.L.; Koh, T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol.*, 2013, Vol. 93 (6), 875–881.
5. Popova, A.; Kzhyshkowska, J.; Nurgazieva, D.; Goerdts S. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*, 2010, 216 (1-2), 164-72.
6. Sridharan, R.; Cameron, A.R.; Kelly, D.J. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today*, 2015, 18, 313-325.

7. Akilbekova, D.; Philip, R.; Graham, A.; Bratlie, K.M. Macrophage reprogramming: influence of latex beads with various functional groups on macrophage phenotype and phagocytic uptake in vitro. *J Biomed Mater Res*, 2015, 103(1), 262–268.
8. Anselmo, A.C.; Zhang, M.; Kumar, S. Elasticity of nanoparticles influences their blood circulation, phagocytosis, endocytosis, and targeting. *ACS Nano*, 2015, 9 (3), 3169–3177.
9. Bygd, H.C.; Forsmark K.D.; Bratlie K.M. Altering in vivo macrophage responses with modified polymer properties. *Biomaterials*, 2015, 56, 187–197.

Information about the authors:

Shapovalova Elena, Specialist in educational and methodological work, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: elenas6691@gmail.com

Ivanyuk Elena Eduardovna, PhD, Research Institute of Oncology, researcher, senior researcher, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: elenakremer@yandex.ru

Domracheva Lubov Vasilyevna, engineer, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: lvdomracheva42@gmail.com