

И.Ю. Малышев<sup>1,2</sup>, С.В. Круглов<sup>1,2</sup>, С.В. Лямина<sup>1</sup>

## **Гипоксия, воспаление и фенотипическая пластичность макрофагов: центральная роль HIF-1 и NFκB**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20/1

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*Снижение содержания кислорода, т.е. гипоксия, в тканях и клетках организма, часто является важным патогенетическим компонентом большого количества заболеваний. В этих случаях гипоксия не только сама по себе является важным компонентом патогенеза заболеваний, но и может оказывать влияние на иммунные реакции, от которых зависит исход этих заболеваний. При этом накопление макрофагов в гипоксических областях и их реакция на гипоксию является ключевым моментом в понимании механизмов влияния гипоксии на иммунитет. Макрофаги играют исключительно важную роль в запуске врожденного иммунного ответа и определяют вектор развития адаптивного ответа. В обзоре проанализированы современные данные о влиянии гипоксии на фенотип и пластичность макрофагов, а также генетические особенности реакции макрофагов на гипоксию. Проанализированы молекулярные механизмы реакции иммунных клеток на гипоксию и роль факторов транскрипции HIF-1 и NF-κB. В совокупности это позволило описать важный биологический феномен — гипоксия-регулируемого контроля фенотипической пластичности макрофагов и обозначить пути поиска новых эффективных подходов в терапии заболеваний связанных с гипоксическими нарушениями иммунитета.*

**Ключевые слова:** гипоксия, HIF-1, NF-κB, воспаление, макрофаги, фенотипическая пластичность макрофагов

I.Yu. Malyshev<sup>1,2</sup>, S.V. Kruglov<sup>1,2</sup>, S.V. Lyamina<sup>1</sup>

## **Hypoxia, inflammation and phenotypic flexibility of macrophages: the central role of HIF-1 and NFκB**

<sup>1</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1, Delegatskay str., Moscow, 127473, Russia

<sup>2</sup> Institute of general pathology and pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

*Decrease of oxygen concentration, i.e. hypoxia, in organism tissues and cells is an important pathogenetic component in a large number of diseases. In these cases hypoxia is not only an important component of diseases pathogenesis, but can also influence immune reactions determining the outcome of diseases. Thus, concentration of macrophages in hypoxic areas and their reaction to hypoxia are the key moments in understanding the mechanisms of hypoxia influence on immunity. Macrophages are of the utmost importance in the congenital immune startup and define the vector of development of the adaptive response. In this review we present updated data on influence of hypoxia on macrophages phenotype and their plasticity, and we also analyze genetic trait of macrophages reaction to hypoxia. Molecular mechanisms of immune cells reaction on hypoxia and the role of transcription factors, HIF-1 and NF-κB, are analyzed. As a whole, it allowed to describe an important biological phenomenon — hypoxia-regulated control of macrophages phenotypic plasticity, and to define ways of search of new effective approaches to the management of diseases with hypoxic disturbances.*

**Key words:** hypoxia, HIF-1, NF-κB, inflammation, macrophages, macrophages phenotypic plasticity

**Для корреспонденции:** Малышев Игорь Юрьевич, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН, зав. каф. патологической физиологии лечебного факультета, ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ. E-mail: iymalyshev1@gmail.com

Для нормального функционирования организма необходимо адекватное снабжение органов и тканей кислородом. Поэтому, снижение содержания кислорода, т.е. гипоксия, в тканях и клетках организма, часто является важным патогенетическим компонентом большого количества заболеваний. В здоровых тканях напряжение кислорода ( $pO_2$ ) составляет, как правило, от 20 до 70 мм рт.ст., тогда как в зонах гипоксии — менее 10 мм рт.ст. [42]. Гипоксия может быть обусловлена недостатком кислорода во вдыхаемом воздухе, недостаточным поступлением кислорода в организм, недостаточным транспортом кислорода к клеткам или нарушением утилизации кислорода в митохондриях. Кроме того, гипоксия может возникать при нарушении кровоснабжения органов в результате развития многих патологий и заболеваний. Это происходит при злокачественных новообразованиях [54], кожных ранах [7], атеросклеротических бляшках [53], переломах костей [8], гипотонии [14], в суставах, пораженных ревматоидным артритом [48], а также при ишемии органов [22]. В этих случаях гипоксия не только сама по себе может быть важным компонентом патогенеза заболеваний, но и оказывать влияние на иммунные реакции, от которых зависит исход этих заболеваний.

*Гипоксия оказывает существенное влияние на развитие воспаления и иммунных реакций организма*

Показано, что гипоксия может индуцировать развитие воспаления. Например, у лиц с горной болезнью отмечается достаточно высокий уровень циркулирующих цитокинов, а пропотевание жидкости вызывает отек легких или головного мозга [20]. Увеличение в сыворотке уровня IL-6, рецептора IL-6 и C-реактивного белка — маркеров воспаления — отмечено у здоровых добровольцев на высоте более 3400 м [23]. У мышей после кратковременной гипоксии наблюдалось изменение проницаемости сосудов, накопление воспалительных клеток во многих органах и повышение уровня цитокинов в сыворотке [13, 45].

Развитие воспаления в ответ на гипоксию является звеном патогенеза разных заболеваний. Так, например, гипоксия/ишемия в органных трансплантатах увеличивает риск воспаления и отторжения трансплантата [5, 31]. В других исследованиях установлено, что при ожирении возникает дисбаланс между потребностью и потреблением кислорода в адипоцитах увеличенного размера, и именно это вызывает тканевую гипоксию. Возникающая в ответ на гипоксию инфильтрация жировой ткани макрофагами и хроническое системное воспаление способствуют развитию инсулинорезистентности [57].

В поврежденных тканях в гипоксических областях действительно очень часто отмечается выраженное накопление иммунных клеток, и, прежде всего макро-

фагов [34]. Увеличение количества макрофагов обнаружено в лишенных сосудов и некротических участках в грудных железах [33], гипоксических зонах кожных ран [33], в зоне атеросклеротических бляшек [30] и в ишемических зонах ретинопатии [15].

Оказалось, что макрофаги могут функционировать в таких неблагоприятных условиях благодаря изменению экспрессии генов и адаптации к гипоксии. При этом, гипоксия может вызывать значимые изменения секреторной активности макрофагов, стимулируя высвобождение проангиогенных и воспалительных цитокинов, а также вызывать изменение морфологии макрофагов [34]. Так, показано, что гипоксия вызывает снижение числа митохондриальных крист, увеличение внутриклеточных «липидных пузырьков» и замедление роста филоподий и «уплощение» макрофагов [6].

При действии гипоксии на макрофаги и другие иммунные клетки происходит изменение спектра поверхностно-клеточных маркеров. Так, например, моноциты отвечают на гипоксию увеличением экспрессии интегринов CD11b/CD18 [47].

Важным аспектом влияния гипоксии на иммунитет являются ее эффекты на выживаемость иммунных клеток. Как правило, гипоксия вызывает гибель клеток за счет апоптоза [34]. Вместе с тем, иммунные клетки могут хорошо переживать периоды гипоксии, и даже функционировать в гипоксических зонах, благодаря активации защитных антиапоптотических механизмов, таких, как накопление белков теплового шока HSP70 [58] и белка с молекулярной массой 150 kDa (ORP150) [43]. Интересно, что более устойчивые к гипоксии макрофаги морфологически отличаются от менее устойчивых. Устойчивые к гипоксии клетки имеют более уплощенную фибробластоподобную форму.

В совокупности эти данные клинических и экспериментальных исследований доказывают, что гипоксия оказывает существенное влияние на развитие иммунных реакций организма. При этом привлечение и скопление макрофагов в областях с низким содержанием кислорода, и изменение функциональной активности макрофагов в этих условиях является ключевым моментом понимания роли гипоксии в развитии иммунного ответа.

*Макрофаги играют центральную роль в развитии воспалительной реакции и иммунного ответа, в целом*

При взаимодействии с вирусами или бактериями, макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины IL-12, IL-15, IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и хемокины CXCL10, CCL8, CCL15, CCL19, CCL20 и CXCL13 [37] (рисунок). Хемокины привлекают в очаг воспаления нейтрофилы, естественные киллеры (ПК), CD4+ Т-лимфоциты (Th0) и CD8+ Т-лимфоциты (Т-клетки) [52]. IL-12 и TNF- $\alpha$  действуя

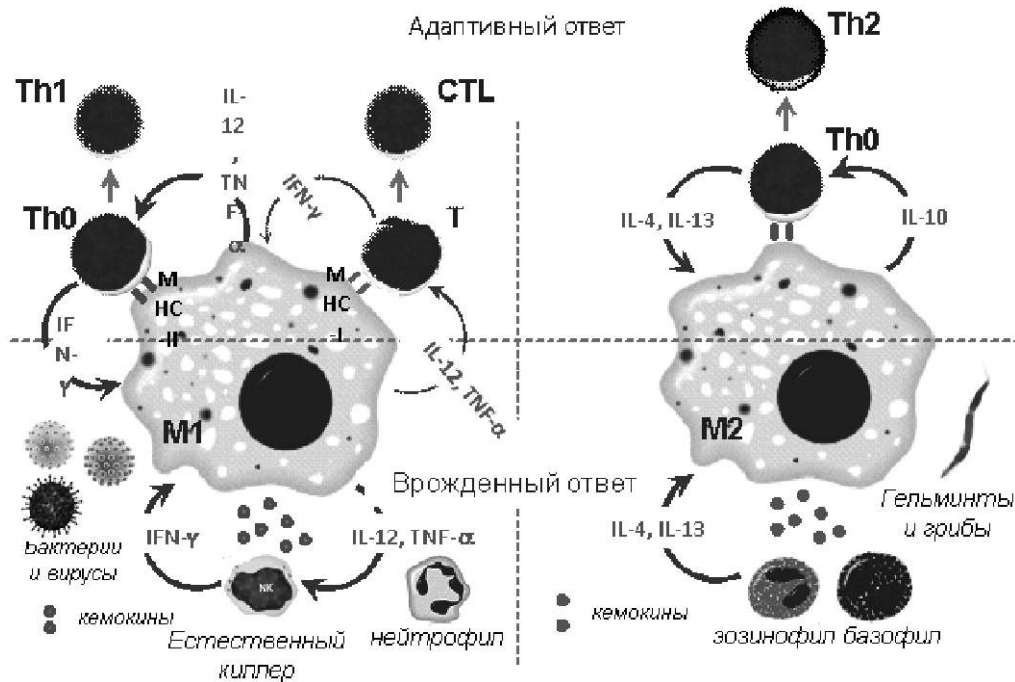
на ЕК и макрофаги, увеличивают секрецию этими клетками  $IFN-\gamma$ .  $IFN-\gamma$  еще больше стимулирует продукцию  $IL-12$  и  $TNF-\alpha$  макрофагами и усиливает их фагоцитарные и бактерицидные свойства. Когда макрофаги взаимодействуют не с бактериями и вирусами, а с экстраклеточными паразитами — грибами или гельминтами, макрофаги секретируют преимущественно противовоспалительные цитокины, такие, как  $IL-10$ ,  $IL-13$  и  $TGF-\beta$  [38] и хемокины  $CCL17$ ,  $CCL13$ ,  $CCL14$ ,  $CCL23$  и  $CCL26$  [37]. Эти хемокины привлекают  $Th0$  лимфоциты, эозинофилы и базофилы, продуцирующие  $IL-4$  и  $IL-13$  [16].  $IL-4$  и  $IL-13$  еще больше стимулируют макрофаги к секреции  $IL-10$  [16], который снижает продукцию провоспалительных цитокинов [12], активных форм кислорода (АФК) и  $NO$  [25], и таким образом, снижает бактерицидные свойства макрофагов.

Реакции макрофагов, ЕК, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов на патогенные микробы или опухолевые клетки знаменует собой развитие врожденного иммунного ответа. При этом, в зависимости от природы патогена, происходит первая волна альтернативного программирования фенотипа макрофагов. Фенотип, формирующийся при действии внутриклеточных микробов и/или  $IFN-\gamma$ , получил название *классический* (провоспалительный) *M1 фенотип*, а фенотип, формирующийся при действии экстраклеточных паразитов и/или  $IL-4$  и  $IL-13$ , получил название *альтернативный* (антивоспалительный) *M2*

*фенотип* [28, 50]. В ходе иммунного ответа макрофаги могут менять свой фенотип. Например, в начале воспаления макрофаги могут иметь провоспалительный *M1* фенотип для того, чтобы убить патогенный микроб, а в конце — антивоспалительный *M2*, для того, чтобы предотвратить избыточное воспаление. Процесс смены фенотипа клетки получил название — «репрограммирование».

*M1* макрофаги имеют округлую форму и продуцируют много провоспалительных цитокинов,  $NO$  и АФК [37, 50], которые обуславливают бактерицидную активность макрофагов. Маркерами *M1* являются рецептор  $IL-2$  и  $MAPK$  рецептор,  $CD80$ ,  $CD86$ ,  $CCR7$ ,  $CXCL10$ ,  $TLR-2$ ,  $TLR-4$ ,  $CD16$ ,  $CD32$ ,  $CD62$ ,  $IL-1R1$ ,  $CD127$ ,  $IL-15R$ ,  $IL-17R$  [37]. *M2* макрофаги, напротив, имеют фибробластоподобную форму и продуцируют много антивоспалительных цитокинов, таких, как  $IL-10$  [37], и значительно меньше АФК и  $NO$ , чем *M1*. Маркерами *M2* являются маннозный рецептор,  $CD163$ ,  $Fc\epsilon RII$ , дектин-1,  $CD209$ ,  $DCIR$ ,  $CLACSF13$ ,  $FIZZ1$ ,  $ST2$ , фагоцитарные рецепторы  $SR-A$  и  $M60$ ,  $CXCR4$ ,  $CD184$ ,  $TRAIL$ ,  $IL-1R\alpha$  [37].

Для успешного уничтожения микроба или опухолевой клетки, макрофаги и *антиген-презентирующие клетки (АПК)* запускают адаптивный иммунный ответ, либо по клеточному  $Th1$  (T helper) и  $CTL$  (Cytotoxic T Lymphocytes) типу, либо по гуморальному  $Th2$  типу [28]. Информацию о целесообразно-



Функционально-клеточная организация врожденного и адаптивного (приобретенного) иммунных ответов. Объяснение в тексте

сти клеточного или гуморального типа адаптивного ответа обеспечивает специфический паттерн макрофагальных цитокинов [44]. Правильный выбор между Th1/CTL и Th2 чрезвычайно важен для успешного уничтожения патогенного фактора, а неадекватный — может лежать в основе разных заболеваний.

Клеточный иммунитет опосредован Th1 клетками и антиген-специфическими цитотоксическими лимфоцитами CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). АПК могут представлять на свою поверхность антигены микробов и опухолевых клеток с помощью молекул МНС-II и МНС-I. МНС-II представляет антиген для CD4+ Th0 клеток, а МНС-I — для CD8+ Т клеток (рис. 1). Формирование клеточного ответа регулируют IFN-γ и IL-12, синтезируемыми M1 фенотипом макрофагов. Эти и другие провоспалительные цитокины способствуют дифференцировке CD4+ Th0 клеток в Th1 клетки, а Т клеток в CTL. При этом IFN-γ регулирует также экспрессию МНС-II на самих макрофагах и АПК [36], тогда как IL-12 усиливает продукцию IgG2a и подавляет IgG1 и IgE, которые ассоциированы с Th1 и Th2 типом ответа, соответственно [17].

Таким образом, M1 макрофаги интегрированы в Th1 и CTL ответы, которые убивают бактерии, вирусы и опухолевые клетки [50].

Гуморальный иммунитет опосредован Th2 клетками и В-лимфоцитами. Антигены экстраклеточных паразитов, M2 макрофаги и их противовоспалительные цитокины IL-10 и IL-4 потенцируют развитие Th0 клеток в Th2 [51]. IL-10 угнетает высвобождение провоспалительных цитокинов и продукцию активных форм O<sub>2</sub> и NO [9], и благодаря этому и угнетению экспрессии МНС-II подавляет развитие Th1 ответа.

Таким образом, M2 клетки интегрированы в Th2 ответ, который убивает экстраклеточных паразитов и обезвреживает токсины. Кроме того, M2 клетки регулируют воспаление, способствуют ремоделированию и репарации тканей, а также способствуют ангиогенезу и опухолевому росту [38].

В целом, можно сделать вывод, что при развитии адаптивного ответа происходит, зависимое от макрофагов, программирование CD4+ Th0 клеток в Th1 или Th2, а CD8+ лимфоцитов в CTL.

Интересно, что Th1 клетки и CTL продуцируют провоспалительные цитокины, аналогичные тем, которые продуцируют M1 макрофаги, а Th2 клетки — противовоспалительные цитокины, аналогичные тем, которые продуцируют M2 макрофаги. Провоспалительные цитокины Т клеток, действуя на макрофаги еще больше поляризуют их в сторону M1 фенотипа, а противовоспалительные — еще больше поляризуют макрофаги в сторону M2 фенотипа [39, 50]. Таким образом, происходит вторая, возвратная волна альтернативного программирования фенотипа макрофагов (ри-

сунок). Процесс взаимозависимого поступательно-возвратного репрограммирования иммунных клеток мы обозначили термином «матричное репрограммирование» [4].

Биологический феномен матричного репрограммирования иммунных клеток обеспечивает необходимую *пластичность иммунного ответа*, т.е. способность быстро менять направленность иммунных реакций с целью наиболее эффективного ответа на проникновение инфекции или изменения в окружающей среде. Представления о макрофаге как о клетке, которая имеет собственную фенотипическую пластичность (M1/M2) и может запускать матричное репрограммирование других иммунных клеток позволяет лучше понять принципы работы иммунной системы и механизмы её нарушения. В этом обзоре мы использовали эти представления применительно к гипоксии.

*Влияние острой гипоксии на фенотип макрофагов имеет двухфазный характер и зависит от исходного генетически детерминированного фенотипа этих клеток*

К настоящему времени мы уже имеем собственные экспериментальные данные [1] о том, каким образом острая гипоксия влияет на фенотип макрофагов и фенотипическую пластичность этих клеток, т.е. способность к репрограммированию (смене фенотипа), каким образом эти эффекты зависят от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов, и наконец, каким образом генетически детерминированный фенотип макрофагов и тип иммунного ответа может влиять на устойчивость организма к острой гипоксии.

Известно, что разные генетические линии животных могут иметь разные исходные фенотипы макрофагов. Например, мыши линии C57/BL6 имеют преимущественно M1 фенотип, тогда как мыши Balb/c — M2 фенотип [55]. В наших экспериментах, мы использовали именно эти две линии мышей. В качестве маркеров фенотипа макрофагов мы использовали продукцию NO, форму клеток и поверхностно-клеточные маркеры. О приобретении макрофагами M1 фенотипа свидетельствовало увеличение продукции NO, увеличение количества макрофагов округлой формы и увеличение поверхностно-клеточных маркеров M1 фенотипа CD80 и CD25, а о приобретении M2 фенотипа — снижение продукции NO, увеличение количества макрофагов фибробластоподобной формы и увеличение маркеров M2 фенотипа CD163 и CD206 [41]. Условия острой гипоксии мы воспроизводили с помощью «подъема» животных в барокамере на высоту 9000 м. Фенотип макрофагов и фенотипическую пластичность макрофагов оценивали через 1 и 12 ч после острой гипоксии.

При определении фенотипа макрофагов через 1 ч после острой гипоксии, оказалось, что острая гипоксия практически не повлияла на фенотип макрофагов мышей BALB/c, но существенно «сдвинула» фенотип мышей линии C57/BL6 в сторону M2 фенотипа. Так, например, после острой гипоксии базальная и ЛПС-стимулированная продукция NO у макрофагов C57/BL6 были снижены более чем в 3 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем [1]. Интересно, что реакция макрофагов на острую гипоксию оказалась как минимум двуфазной. Через 12 ч после острой гипоксии, в отличие от первого часа, и макрофаги мышей линии BALB/c, и макрофаги C57/BL6 стали менять свой фенотип в сторону провоспалительного M1 фенотипа.

Таким образом, при анализе реакции макрофагов на острую гипоксию необходимо учитывать две важные особенности:

1) реакция макрофагов на острую гипоксию существенно зависит от генетически детерминированного первоначального фенотипа клеток: M2 макрофаги мышей BALB/c в первые часы после острой гипоксии не меняют свой фенотип, тогда как M1 макрофаги мышей C57/BL6 трансформируют свой фенотип в сторону M2;

2) реакция макрофагов на острую гипоксию имеет две фазы: срочную (1-й ч) и отдаленную (12 ч). В M2 макрофагах мышей BALB/c первая фаза характеризуется отсутствием изменений фенотипа, а вторая отдаленная — выраженным смещением фенотипа в сторону провоспалительного M1. В M1 макрофагах мышей C57/BL6 реакция на острую гипоксию имеет инвертированный характер: первая стадия характеризуется существенным сдвигом в сторону M2 фенотипа, а вторая отдаленная — напротив смещением фенотипа в сторону провоспалительного M1.

В связи с этим возникает несколько резонных вопросов, почему в первый час после острой гипоксии макрофаги C57/BL6 (M1 фенотип) программируются гипоксией в сторону M2 фенотипа, а макрофаги BALB/c (M2 фенотип) остаются неизменными, и почему отдаленные последствия острой гипоксии проявляются провоспалительной реакцией макрофагов.

На сегодняшний день, известно большое количество факторов, которые могут изменять фенотип макрофагов в сторону M1 или M2 фенотипа. Так, провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , патоген-ассоциированные молекулы ЛПС, липопroteины, различные микробы и белки теплового шока способны программировать макрофаги на M1 фенотип, тогда как противовоспалительные цитокины IL-4 и IL-13, иммунные комплексы с IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF- $\beta$ , некоторые внутриклеточные патогены, витамин D3,

глюкокортикоиды, апоптотические клетки способствуют формированию M2 фенотипа [38].

Факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M1, мы обозначили как ФРМ1, а факторы, которые репрограммируют фенотип макрофагов в сторону M2 — как ФРМ2 [3]. Например, к ФРМ1 относятся IFN- $\gamma$  и пониженные концентрации сыворотки, а к ФРМ2 — IL-4 и повышенные концентрации сыворотки. Очевидно, что анализ перитонеальной жидкости, откуда мы выделяли макрофаги после острой гипоксии, мог бы помочь ответить на вопрос, какие из присутствующих ФРМ могли бы программировать макрофаги.

#### *Влияние острой гипоксии*

*на фенотипическую пластичность макрофагов  
зависит от исходного генетически  
детерминированного фенотипа этих клеток*

Для оценки фенотипической пластичности макрофагов, мы разработали специальную методику, основанную на использовании сыворотки (FBS) в концентрациях — 0%, 10%, 40%. Существование методики состояло в том, чтобы оценить способность макрофагов менять свой фенотип в сторону M1 под действием ФРМ1 — 0% FBS, и в сторону M2 под действием ФРМ2 — 40% FBS.

Оказалось, что в первый час после острой гипоксии изменения фенотипической способности макрофагов BALB/c и C57 практически не происходило. Влияние острой гипоксии проявилось в отдаленный период, через 12 ч. В макрофагах мышей BALB/c (исходный M2 фенотип) это проявилось увеличением способности макрофагов приобретать M1 фенотип, при отсутствии влияния на способность приобретать M2 фенотип. В макрофагах мышей C57/BL6 (исходный M1 фенотип) это проявилось, напротив, увеличением способности макрофагов приобретать M2 фенотип, при отсутствии влияния на способность приобретать M1 фенотип.

Таким образом, влияние острой гипоксии на фенотипическую пластичность существенно зависит от генетически детерминированного исходного фенотипа макрофагов. При этом в эффектах гипоксии наблюдается четкая альтернативная реципрокность: в M2 фенотипе макрофагов (BALB/c), гипоксия увеличивает способность приобретать M1 фенотип, и наоборот, в M1 фенотипе (C57) — способность приобрести M2 фенотип.

Оценка фенотипа и фенотипической пластичности иммунных клеток в клинике может иметь важное значение. Фенотипическая пластичность, то есть способность клеток менять свой фенотип играет ключевую роль в адекватном развитии иммунного ответа, когда например первоначальный провоспалительный ответ

(M1), направленный на уничтожение инфекции, должен смениться противовоспалительным (M2), направленным на предупреждение избыточного воспаления и повреждения здоровых тканей. Не исключено, что индуцированное гипоксией патологическое изменение пластичности может играть роль в развитии провоспалительных заболеваний, когда макрофаги приобретают избыточную способность менять свой фенотип на провоспалительный M1. Таким образом, оценка фенотипа макрофагов и их пластичности может иметь диагностическое значение. Кроме того, оценка фенотипической пластичности иммунных клеток может показать, каковы резервы для коррекции патологического фенотипа. И, наконец, методы коррекции фенотипа макрофагов и их пластичности может быть основой для разработки новых способов терапии гипоксических состояний.

*Мыши линии BALB/c (M2 фенотип) обладают большей устойчивостью к острой гипоксии по сравнению с мышами линии C57 (M1 фенотип)*

После того, как мы показали, что острая гипоксия оказывает существенное влияние на функциональный фенотип макрофагов, перед нами сразу стал вопрос, а существует ли обратное влияние, т.е. оказывает ли влияние генетически детерминированный фенотип макрофагов, и соответственно определенный тип иммунного ответа, на устойчивость животных к острой гипоксии. Тем более, что хорошо было известно, что разные популяции крыс могут существенно отличаться по своей устойчивости к острой гипоксии [2].

Устойчивость мышей к острой гипоксии, мы изучили на модели острой гипоксии, вызывающей гибель животных. В наших исследованиях [1] оказалось, что мыши линии BALB/c обладают значительно большей устойчивостью к острой гипоксии, чем мыши линии C57/BL6. Так при подъеме мышей на высоту 9000 м в барокамере погибло 63% мышей линии C57/BL6, и только 28% мышей линии BALB/c.

Понять почему макрофаги BALB/c, имеющие M2 фенотип, более устойчивы к репрограммирующему действию острой гипоксии (на первый час после острой гипоксии) и почему мыши BALB/c более устойчивы к острой гипоксии, по сравнению с C57/BL6, могут помочь данные J.K. Yun et al., 1997; Y. Tsukamoto et al., 1996 [58]. Эти авторы показали, что более устойчивые к гипоксии макрофаги морфологически отличаются от менее устойчивых. Устойчивые к гипоксии клетки имеют более уплощенную фибробластоподобную форму. Мы сегодня знаем, что такую форму имеют макрофаги M2 фенотипа. Эти данные согласуются с тем, что мыши BALB/c, имеющие более устойчивый к гипоксии фенотип клеток, имеют большую выживаемость при острой гипоксии, по сравнению с мышами линии C57/BL6, которые имеют M1 фенотип [58].

Тем не менее, мы пока не можем дать четкого ответа на вопрос, через какие молекулярные механизмы острая гипоксия оказывает влияние на активность иммунных клеток и связаны ли различия в смертности мышей разных генетических линий с различиями в фенотипе макрофагов и иммунном ответе на острую гипоксию. Для того, чтобы инициировать анализ и поиск ответов на эти важные вопросы, надо прежде разобраться с внутриклеточными молекулярными механизмами реакции макрофагов на гипоксию. Этому посвящена оставшаяся часть обзора.

*Молекулярные механизмы реакции иммунных клеток на гипоксию: роль HIF-1 и NF-κB-зависимого сигналинга и NO*

Известно, что во многих случаях эффекты гипоксии опосредуют сигнальные механизмы, связанные с гипоксическим фактором транскрипции HIF-1, а воспаления — с воспалительным фактором транскрипции NF-κB. При рассмотрении иммунных реакций и анализе механизмов репрограммирования иммунных клеток, HIF-1 привлек большое внимание, когда было обнаружено, что в условиях гипоксии, которая практически всегда формируется в фокусе воспаления, в иммунных клетках активируются HIF-зависимые сигнальные пути [11]. О значимой роли HIF-1 в развитии иммунных ответов также свидетельствуют данные, полученные на мышях с удаленным HIF-1 [46]. В этих и других экспериментах установлено, что HIF-1 каким-то образом вовлечен в бактерицидные эффекты макрофагов [11], но самое главное, обеспечивает возможность макрофагов выполнять свои функции в гипоксических условиях. Другой фактор транскрипции, NF-κB, который имеет хорошо доказанную роль в иммунных ответах, привлек внимание, когда обнаружилось, что гипоксия может приводить к деградации ингибитора этого фактора транскрипции [19] и таким образом активировать NF-κB.

*Роль HIF-1 в эффектах гипоксии на иммунные ответы*

В поддержании гомеостаза кислорода в организме и адаптации клетки к гипоксии главную роль играет активность HIF-1. HIF-1 представляет собой гетеродимер из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1β и субъединицы HIF-α (HIF-1α и HIF-2α), уровень которых тщательно регулируется содержанием кислорода [48]. Хотя HIF-1α продуцируется непрерывно клетками с нормальным содержанием кислорода, он быстро разрушается с помощью убиквитин-зависимого протеолиза в присутствии кислорода [49]. Снижение уровня кислорода приводит к быстрому увеличению содержания субъединицы HIF-1α, образованию гетеродимера и активации HIF-1. Активный HIF-1 связывается с чувствительными к гипоксии элементами HRE

генов, которые содержат последовательность 58-CGTG-38. HRE присутствуют в промоторах многих генов, отвечающих за метаболизм кислорода [49], поэтому при активации HIF-1 увеличивается экспрессия генов, белковые продукты которых усиливают транспорт кислорода, эритропоэз, ангиогенез и гликолиз [48], а также клеточную дифференцировку и апоптоз. Таким образом, HIF-1 помогает клетке оптимизировать клеточную энергопродукцию и гомеостаз для выживания и функционирования в среде со сниженным уровнем кислорода. Элементы, чувствительные к действию HIF-1, были обнаружены в генах, кодирующих Toll-like рецепторы (TLRs), включая TLR2 и TLR6, которые активируются в ответ на гипоксию [32]. Наконец, HIF-1 увеличивает высвобождение провоспалительных цитокинов и экспрессию костимулирующих молекул дендритными клетками, помогая активации врожденного и адаптивного иммунного ответов [27].

Нейтрофилы и макрофаги должны обладать хорошей способностью адаптироваться к условиям недостатка кислорода, поскольку многие патогенные бактерии прекрасно размножаются в гипоксических условиях. О значимой роли HIF-1 в развитии иммунных ответов свидетельствуют данные, полученные на мышцах с удаленным HIF-1 [26, 46]. Так, в макрофагах и нейтрофилах с удаленным HIF-1 отмечено существенное снижение уровня клеточного АТФ, что показывает значимую роль этого фактора транскрипции для энергопродукции путем гликолиза в иммунных клетках [11]. Макрофаги, изолированные от мышечной ткани с удаленным HIF-1, обладают сниженной способностью к обезвреживанию бактерий по сравнению с мышцами дикого типа [11]. Данные об активации HIF-1 в пораженных тканях пациентов с ревматоидным артритом [24], дерматомиозитом [29], волчанкой у новорожденных [10] и атеросклерозе [56] позволяют предположить важную роль HIF-1 при различных иммунопатологиях.

В условиях гипоксии, которая практически всегда формируется в очаге воспаления, в миелоидных клетках активируются HIF-зависимые сигнальные пути [11]. Активация HIF-1 позволяет иммунным клеткам проявлять в условиях гипоксии подвижность, бактериальную и фагоцитарную активность. Кроме того HIF-1 $\alpha$  за счет подавления апоптоза увеличивает продолжительность жизни нейтрофилов в условиях гипоксии в очаге воспаления. Анализ взаимодействия организма с патогеном выявили несколько аспектов функций макрофагов, которые зависят от HIF-1. Так увеличение уровней HIF-1 было обнаружено во время дифференцировки моноцитов крови в тканевые макрофаги [18]. Активность HIF-1 играет важную роль в фагоцитарном захвате бактерий макрофагами в условиях гипоксии [21], продукции макрофагами TNF- $\alpha$  и синтезе NO [6].

HIF-1 вовлечен не только в развитие, но и в регуляцию адаптивного иммунитета. Так, например, увеличение продукции HIF-1 $\alpha$  и активация HIF-1 в Т-клетках, за счет увеличения продукции интерлейкина-10 и снижения уровня IFN- $\gamma$ , способствует изменению фенотипа клеток с Th1, усиливающего клеточный адаптивный ответ и цитотоксические функции макрофагов и Т-клеток, на Th2 фенотип, ингибирующий Th1 ответ и бактерицидное действие макрофагов и Т-клеток. Показано, что HIF-1 также влияет на регуляторные Т-клетки, а именно стимулирует дифференцировку и пролиферацию этих Т-клеток и таким образом защищает ткани от чрезмерных эффектов цитотоксических Т-клеток.

### *Роль NF- $\kappa$ B*

#### *в эффектах гипоксии на иммунные ответы*

Выраженное влияние гипоксии на развитие иммунных реакций связано также с тем, что ключевой фактор транскрипции провоспалительных генов — NF- $\kappa$ B является кислородо-чувствительным [40]. Более того, имеются данные о наличии регуляторной связи между NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$ , что хорошо объясняет влияние гипоксии на механизмы иммунитета и воспаления [42]. NF- $\kappa$ B — гетеродимерный фактор транскрипции, состоящий из субъединиц p65 и p50. В условиях нормального содержания кислорода NF- $\kappa$ B находится в неактивном виде в цитоплазме. Инактивацию NF- $\kappa$ B обеспечивает связывание ингибитора I- $\kappa$ Ba с субъединицами NF- $\kappa$ B. Это препятствует перемещению фактора транскрипции в ядро. Гипоксия индуцирует распад ингибитора I- $\kappa$ Ba и активацию NF- $\kappa$ B [19]. Активный NF- $\kappa$ B проникает в ядро и индуцирует в макрофагах гены PGE2 [35] IL-1, TNF- $\alpha$  и IL-12 [19].

Таким образом, открытые вопросы об изменении HIF-1- и NF $\kappa$ B-контролируемых сигнальных путей в разных фенотипах макрофагов и при их репрограммировании существенно ограничивают наше понимание патогенеза воспалительных заболеваний, сопровождающихся клеточной и тканевой гипоксией. Дополнительные эксперименты могли бы привести к описанию важного биологического феномена — гипоксия-регулируемого контроля фенотипической пластичности макрофагов. Это, безусловно, расширит существующие представления о молекулярных механизмах воспалительной реакции и пластичности всего иммунного ответа. Данные о возможности модулирования гипоксией — зависимой регуляции функционального фенотипа макрофагов позволят искать новые эффективные подходы в терапии заболеваний, связанных с гипоксическими нарушениями иммунитета.

*Работа поддержана грантами ГК №П811 и ГК 16.740.11.0007 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг.*

## Список литературы

1. **Круглов С.В., Калиш С.В., Малышева Е.В.** и соавт. Устойчивость к острой гипоксии и изменение фенотипа и фенотипической пластичности макрофагов мышей разных генетических линий // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2012. — в печати.
2. **Лукьянова Л.Д.** Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. — 1997. — Т. 124, №9. — С. 244—254.
3. **Лямина С.В., Круглов С.В., Веденикин Т.Ю.** и соавт. Альтернативное репрограммирование M1/M2 фенотипа перитонеальных макрофагов мышей *in vitro* с помощью интерферона гамма и интерлейкина 4 // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2011. — 4. — С. 235.
4. **Малышев И.Ю.** Матричное репрограммирование иммунных клеток и роль его нарушения в патогенезе опухолей // Вестник РОНЦ. — 2012. — в печати.
5. **Andrade C.F., Kaneda H., Der S.** et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation // J. Heart Lung Transplant. — 2006. — Vol. 25. — P. 1317—1323.
6. **Angermuller S., Schunk M., Kusterer K.** Alteration in xanthine oxidase activity in sinusoidal endothelial cells and morphological changes of Kupffer cells in hypoxic and reoxygenated rat liver // Hepatology. — 1995. — Vol. 21. — P. 1594—1601.
7. **Arnold F., West D., Kumar S.** Wound healing: the effect of macrophage and tumour-derived angiogenesis on skin graft vascularisation // Br. J. Exp. Pathol. — 1987. — Vol. 68. — P. 569—574.
8. **Ayala A., Ertel W., Chaudry I.H.** Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II complex in leukocytes // Shock. — 1995. — Vol. 5. — P. 79—90.
9. **Bogdan C., Vodovotz Y., Nathan C.** Macrophage deactivation by interleukin 10 // The Journal of Experimental Medicine. — 1991. — Vol. 174. — P. 1549—1555.
10. **Clancy R.M.** Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block // Arthritis Rheum. — 2007. — Vol. 56. — P. 4120—4131.
11. **Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E.** et al. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation // Cell. — 2003. — Vol. 112. — P. 645—657.
12. **D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N.M.** et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells // J. Exp. Med. — 1993. — Vol. 178(3). — P. 1041—1048.
13. **Eckle T., Faigle M., Grenz A.** et al. A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak // Blood. — 2008. — Vol. 111. — P. 2024—2035.
14. **Ertel W., Singh G., Morrison M.H.** et al. Chemically induced hypotension increases PGE2 release and depresses macrophage antigen presentation // Am. J. Physiol. — 1993. — Vol. 264. — R655—R660.
15. **Esser P., Heimann K., Wiedemann P.** Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic-retinopathy-differentiation of subpopulations // Br. J. Ophthalmol. — 1993. — Vol. 77. — P. 731—733.
16. **Falcone F.H., Haas H., Gibbs B.F.** The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses // Blood. — 2000. — Vol. 96(13). — P. 4028—4038.
17. **Germann T., Gately M.K., Schoenhaut D.S.** et al. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells // Eur. J. Immunol. — 1993. — Vol. 23(8). — P. 1762—1770.
18. **Ghezzi P., Dinarello C.A., Bianchi M.** et al. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumour necrosis factor by human mononuclear cells // Cytokine. — 1991. — Vol. 3. — P. 189—194.
19. **Grimm S., Baeuerle P.A.** The inducible transcription factor NF- $\kappa$ B: structure-function relationship of its protein subunits // Biochem. J. — 1993. — Vol. 290. — P. 297—308.
20. **Grocott M.P.W., Martin D.S., Levett D.Z.H.** et al. Arterial blood gases and oxygen content in climbers on Mount Everest // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 360. — P. 140—149.
21. **Gyetko M.R., Todd R.F., Wilkinson C.C.** et al. The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis *in vitro* // J. Clin. Invest. — 1994. — Vol. 93. — P. 1380—1387.
22. **Hammes H.P., Lin J.H., Bretzel R.G.** et al. Upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat // Diabetes. — 1998. — Vol. 47. — P. 401—406.
23. **Hartmann G., Tschyp M., Fischer R.** et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and C-reactive protein // Cytokine. — 2000. — Vol. 12. — P. 246—252.
24. **Hollander A.P., Corke K.P., Freemont A.J., Lewis C.E.** Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint // Arthritis Rheum. — 2001. — Vol. 44. — P. 1540—1544.
25. **Hu S., Sheng W.S., Peterson P.K., Chao C.C.** Differential regulation by cytokines of production of nitric oxide by human astrocytes // Glia. — 1995. — Vol. 15. — P. 491—494.
26. **Iyer N.V.** et al. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  // Genes Dev. — 1998. — Vol. 12. — P. 149—162.
27. **Jantsch J.** et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function // J. Immunol. — 2008. — Vol. 180. — P. 4697—4705.
28. **Kamogawa Y., Minasi L.A., Carding S.R.** et al. The relationship of IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells // Cell. — 1993. — Vol. 75. — P. 985.
29. **Kontinen Y.T.** et al. Disease-associated increased HIF-1,  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and Flt-1 do not suffice to compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies // Rheumatol. Int. — 2004. — Vol. 24. — P. 333—339.
30. **Knieriem H.J., Jurukova Z.** Proteolytic enzyme release by macrophages in the destabilisation process of atherosclerotic plaques // Atherosclerosis. — 1997. — Vol. 134. — P. 233.
31. **Kruger B., Krick S., Dhillon N.** et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — Vol. 106. — P. 3390—3395.
32. **Kuhlicke J., Frick J.S., Morote Garcia J.C.** et al. Hypoxia inducible factor (HIF). 1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia // PLoS-ONE. — 2007. — Vol. 2. — P. 1364.
33. **Lewis J.S., Landers R.J., Harris A.L., Lewis C.E.** Expression of vascular endothelial growth factor is upregulated by macrophages in poorly vascularised areas of breast carcinomas // J. Pathol. — 1999. — Vol. 189 (Suppl.). — 13A.
34. **Lewis J.S., Lee J.A., Underwood J.C.E.** et al. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms // Journal of Leukocyte Biology. — 1999. — Vol. 66. — P. 889—900.



35. *Lo C.J., Cryer H.G., Fu M.J., Lo F.R.* Regulation of macrophage eicosanoid generation is dependent on nuclear factor kappa B // *J. Trauma.* — 1998. — Vol. 45. — P. 19–23.
36. *Mach B., Steimle V., Martinez-Soria E., Reith W.* // *Ann. Rev. Immunol.* — 1996. — Vol. 14. — P. 301–331.
37. *Mantovani A., Sica A., Locati A.* New vistas on macrophage differentiation and activation // *Europ. J. Immunol.* — 2006. — Vol. 37(1). — P. 14–16.
38. *Martinez F.O., Gordon S., Locati A., Mantovani A.* Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — P. 7303–7311.
39. *Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M.* Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
40. *Marui N., Offermann M.K., Swerlick R.* et al. // *J. Clin. Invest.* — 1993. — Vol. 92. — P. 1866–1874.
41. *Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M.* et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // *The Journal of Immunology.* — 2000. — Vol. 164. — P. 6166–6173.
42. *Nizet V., Johnson R.S.* Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews // Immunology.* — 2009. — Vol. 9. — P. 609–617.
43. *Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M.* et al. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274(10). — P. 6397–6404.
44. *Paul W.E., Seder R.A.* Lymphocyte responses and cytokines // *Cell.* — 1994. — Vol. 76. — P. 241–251.
45. *Rosenberger P., Schwab J.M., Mirakaj V.* et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia // *Nat. Immunol.* — 2009. — Vol. 10. — P. 195–202.
46. *Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S.* HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization // *EMBO J.* — 1998. — Vol. 17. — P. 3005–3015.
47. *Scannell G.* Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions // *N. Horiz.* — 1996. — Vol. 4. — P. 179–183.
48. *Semenza G.L.* Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 // *Physiology (Bethesda).* — 2009. — Vol. 24. — P. 97–106.
49. *Shih S., Claffey K.P.* Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells // *Int. J. Exp. Pathol.* — 1998. — Vol. 79. — P. 347–357.
50. *Sica A., Mantovani A., Locati M.* Macrophage activation and polarization // *Front Biosci.* — 2008. — Vol. 1(13). — P. 453–461.
51. *Sieling P.A., Abrams J.S., Yamamura M.* et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy // *J. Immunol.* — 1993. — Vol. 150(12). — P. 5501–5510.
52. *Sharma M.* Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease // *Critical Reviews in biotechnology.* — 2009. — P. 1–22.
53. *Simanonek J.P.* Non-ishaemic hypoxia of the arterial wall is a primary cause of atherosclerosis // *Med. Hypoth.* — 1996. — Vol. 46. — P. 155–161.
54. *Thompson L.F., Eltzschig H.K., Ibla J.C.* et al. Crucial role for ecto-5 $\alpha$ -nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia // *J. Exp. Med.* — 2004. — Vol. 200. — P. 1395–40511.
55. *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. — Vol. 51(10). — P. 1021–1028.
56. *Vink A.* et al. HIF-1 $\alpha$  expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages // *Atherosclerosis.* — 2007. — Vol. 195. — P. 69–75.
57. *Ye J.* Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance // *Int. J. Obes. (Lond.).* — 2009. — Vol. 33. — P. 54–66.
58. *Yun J.K., McCormick T.S., Villabona C.* et al. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94(25). — P. 13903–13908.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

*Круглов Сергей Васильевич*, канд. биол. наук, вед. научн. сотр. лаб. клеточных биотехнологий, ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ, старш. науч. сотр., лаб. стресса и адаптации ФГБУ «НИИОПП» РАМН

*Лямина Светлана Владимировна*, канд. мед. наук, старш. научн. сотр. лаб. клеточных биотехнологий, ассистент каф. факультетской терапии и профболезней ГБОУ ВПО «МГМСУ» Минздравсоцразвития РФ