

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-35-39

УДК 57.017.35

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2019

## Фенотипический полиморфизм клеток Купфера печени крыс в норме

А. В. Ельчанинов<sup>1\*</sup>, А. В. Лохонина<sup>1, 2</sup>, А. В. Макаров<sup>1, 3</sup>, П. А. Вишнякова<sup>1</sup>,  
Е. Ю. Кананыхина<sup>4</sup>, М. П. Никитина<sup>4</sup>, М. В. Гринберг<sup>2</sup>, А. В. Быков<sup>3</sup>,  
И. Г. Чарыева<sup>3</sup>, Г. Б. Большакова<sup>4</sup>, Т. Х. Фатхудинов<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

**Цель** исследования – оценить иммунофенотип резидентных макрофагов печени, клеток Купфера, у крыс в норме.

**Материал и методы.** В работе использовали самцов крыс Вистар (n=6), у которых под эфирным наркозом забирали фрагмент срединной доли печени. Полученный материал фиксировали в жидком азоте, после чего готовили криосрезы толщиной 5–7 мкм. На гистологических препаратах с помощью набора антителами выявляли экспрессию ряда маркеров макрофагов: CD68, CD206, CD 163, CD86 после первых антител срезы докрашивали антителами, конъюгированными с FITC, ядра клеток выявляли с помощью DAPI, полученные препараты изучали с помощью флуоресцентного микроскопа.

**Результаты.** При анализе экспрессии CD68 в печени крыс, установлено, что в норме примерно 20% клеток в поле зрения приходится на CD68<sup>+</sup> клетки, что согласуется с нашими более ранними исследованиями. Количество CD163<sup>+</sup> и CD206<sup>+</sup> клеток совпадало с количеством CD68<sup>+</sup> макрофагов, в то время как CD86<sup>+</sup> макрофагов было значительно меньше.

**Выводы.** В нормальных условиях популяция резидентных макрофагов печени крыс представлена клетками с выраженной экспрессией CD68, CD163 и CD206. Большое количество CD163<sup>+</sup> и CD206<sup>+</sup> макрофагов позволяет заключить, что клетки Купфера близки к M2-прогенераторным фенотипу. Однако выявление CD86<sup>+</sup> резидентных макрофагов свидетельствует о наличии M1-макрофагов, или о присутствии в печени крыс в норме макрофагов с промежуточным между M1- и M2-фенотипом. Выявленное высокое содержание в печени макрофагов, экспрессирующих CD163 и CD206, свидетельствует не только о прогенераторных свойствах клеток Купфера, но также о тесной связи макрофагов с функциями печени, поскольку указанные рецепторы участвуют в утилизации гемоглобина и ряда гормонов.

**Ключевые слова:** крысы Вистар; клетки Купфера; иммунофенотип; макрофаги, печень.

### Phenotypic Polymorphism of Normal Rat Liver Kupffer Cells

© A. V. El'chaninov<sup>1\*</sup>, A. V. Lokhonina<sup>1, 2</sup>, A. V. Makarov<sup>1, 3</sup>, P. A. Vishnyakova<sup>1</sup>, E. Yu. Kananykhina<sup>4</sup>,  
M. P. Nikitina<sup>4</sup>, M. V. Grinberg<sup>2</sup>, A. V. Bykov<sup>3</sup>, I. G. Charyeva<sup>3</sup>, G. B. Bol'shakova<sup>4</sup>, T. Kh. Fatkhudinov<sup>2, 4</sup>, 2019

<sup>1</sup>V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

**The aim** of study was to evaluate the immunophenotype of resident macrophages of the liver, Kupffer cells, in rats in the norm.

**Material and methods.** The study included male Wistar rats' samples (n=6) that presented fragments of the middle lobe of the liver taken under ether anesthesia. The obtained samples were fixed in liquid nitrogen, after that cryosections 5–7 μm thick were prepared. Histological slides were used to detect the expression of a number of macrophage markers with an antibody kit: CD68, CD206, CD 163, CD86. After the first antibodies, sections were stained with antibodies conjugated to FITC, cell nuclei were detected using DAPI, the obtained preparations were studied using a fluorescence microscope.

**Results.** When analyzing the expression of CD68 in the rat liver, it was found that normally about 20% of the cells in the field of vision appeared to be CD68<sup>+</sup> cells, which was consistent with the earlier study results of the authors. The number of CD163<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> cells coincided with the number of CD68<sup>+</sup> macrophages, while CD86<sup>+</sup> macrophages were significantly less.

**Conclusions.** Under normal conditions, the population of resident macrophages of the rat liver is represented by cells with pronounced expression of CD68, CD163 and CD206. A large number of CD163<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> macrophages allows concluding that Kupffer cells are close to the M2 pro-regenerative phenotype. However, the detection of CD86<sup>+</sup> resident macrophages indicates the presence of M1 macrophages, or the presence of normal macrophages with an intermediate M1 and M2 phenotype, in the rat liver. The revealed high content of macrophages expressing CD163 and CD206 in the liver evidences not only pro-regenerative properties of Kupffer cells,

but also the close connection of macrophages with liver functions, since these receptors are involved in the utilization of hemoglobin and a number of hormones.

**Key words:** rats, Wiatsr; Kupffer cells; immunophenotype; macrophages; liver.

#### Автор для переписки:

Ельчанинов Андрей Владимирович  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, ул. Академика Опарина, 4, Москва, 117198, Россия  
E-mail: elchandrey@yandex.ru

#### Corresponding author:

Andrei El'chaninov  
V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, ul. Akademika Oparina, 4, 117198, Moscow, Russia  
E-mail: elchandrey@yandex.ru

## Введение

Макрофаги представляют собой клетки системы врожденного иммунитета, выполняющие помимо защитной множество других функций: регуляцию дифференцировки и пролиферации клеток, клеточной гибели, ремоделирование межклеточного матрикса, участие в липидном обмене и др. [18]. Такое разнообразие выполняемых функций макрофагов может быть связано с их высокой фенотипической пластичностью [14, 15]. Как правило, органы млекопитающих содержат смешанную популяцию макрофагов из разных источников происхождения, за исключением ЦНС и печени, где в норме практически полностью отсутствуют макрофаги моноцитарного происхождения [6, 16, 17].

В настоящее время функциональное состояние макрофагов при том или ином процессе описывается в рамках M1/M2-парадигмы, где M1 – классически активированные макрофаги, обладающие провоспалительными свойствами, и M2 – альтернативно активированные толерогенные макрофаги, способствующие разрешению воспаления [12]. Неясно, как соотносятся макрофаги различных генераций с классификацией макрофагов по типу активации. В соответствии с одним из представлений резидентные макрофаги, имеющие эмбриональное происхождение, выполняют роль M2-макрофагов, тогда как мигрирующие макрофаги моноцитарного (костномозгового) происхождения – M1[8].

Цель работы – сравнить иммунофенотип резидентных макрофагов на примере клеток Купфера и макрофагов, производных моноцитов.

## Материал и методы исследования

Самцы крыс аутбредного стока Вистар массой тела 250–300 г были получены из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание и уход за лабораторными животными осуществляли в соответствии с

«Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. №267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г. На проведение исследования получено разрешение биоэтического комитета ФГБНУ «НИИМЧ», протокол № 7 от 04.02.2019 г.

Животных (n=6) наркотизировали диэтиловым эфиром (МедХимПром, Россия), после чего вскрывали брюшную полость и удаляли фрагмент срединной доли печени. Полученный материал фиксировали в жидком азоте, после чего готовили криостатные срезы толщиной 5–7 мкм. На гистологических препаратах с помощью набора антител выявляли экспрессию ряда маркеров макрофагов: CD68 (1:100, Abcam, Великобритания), CD206 (1:100, Santa-Cruz, США), CD 163 (1:100, Santa-Cruz, США), CD86 (1:100, Abcam, Великобритания). После первых антител срезы докрашивали антителами, конъюгированными с FITC (Abcam, Великобритания), ядра клеток докрашивали DAPI (Sigma-AldrichCo LLC, США). На препаратах подсчитывали клетки, экспрессирующие тот или иной маркер, затем вычисляли соответствующий индекс как отношение окрашенных клеток к общему числу клеток в %.

Окрашенные макрофаги изучали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (LeicaMicrosystems, Германия).

Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, США) с использованием рангового однофакторного дисперсионного анализа ANOVA on Ranks. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Далее группы попарно сравнивали с использованием критерия Tukey. При сравнении были получены следующие результаты:

### All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0.05
CD68 vs CD86	102.000	5.889	Yes
CD68 vs CD163	48.000	2.771	No
CD68 vs CD206	42.000	2.425	No
CD206 vs CD86	60.000	3.464	No
CD206 vs CD163	6.000	0.346	No
CD163 vs CD86	54.000	3.118	No

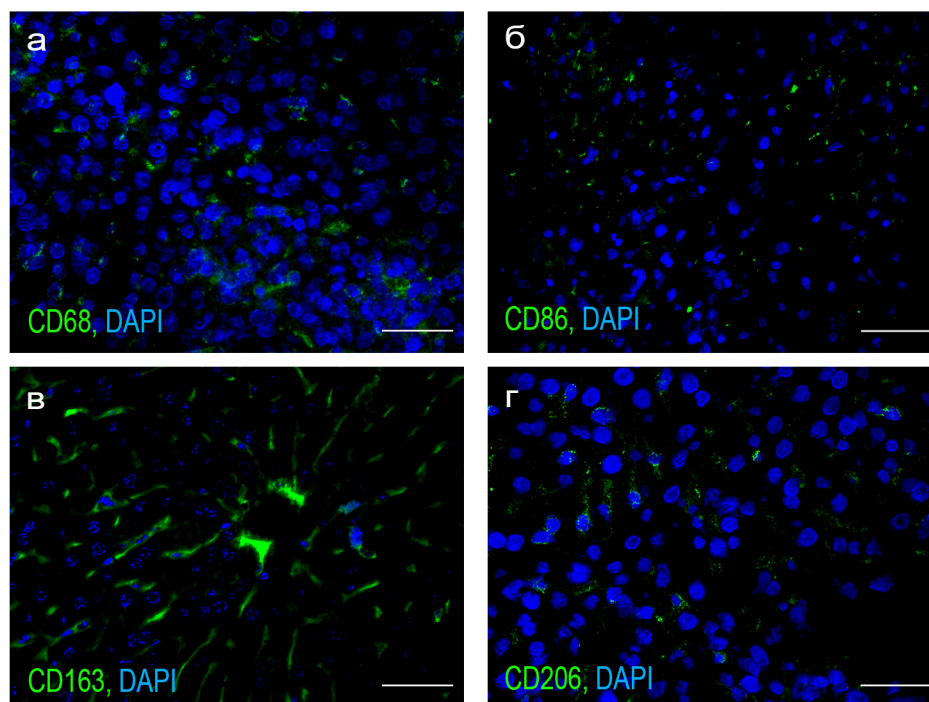


Рис. 1. Иммунофенотип резидентных макрофагов печени, клеток Купфера, в норме у крыс. Обозначения: а – экспрессия маркера CD68, б – экспрессия маркера CD 86, в – экспрессия маркера CD 163, г – экспрессия маркера CD 206. Флуоресцентная микроскопия, FITC – зеленое окрашивание, ядра докрашены DAPI – синее свечение, масштабный отрезок – 50 мкм, ок. 10, об. 40.

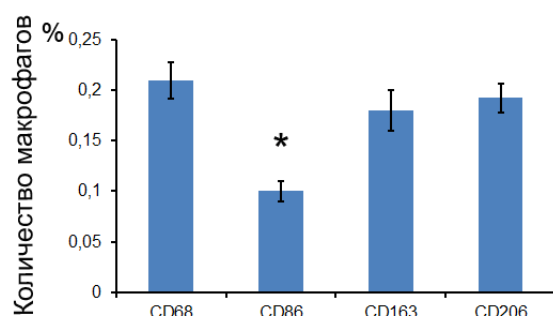


Рис. 2. Фенотипическая характеристика резидентных макрофагов печени крыс в норме. Обозначения: по оси ординат – доля макрофагов, экспрессирующих тот или иной маркер, %; по оси абсцисс – наименования маркеров макрофагов, полосы погрешности – доверительные интервалы, \* – статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ).

## Результаты и их обсуждение

В нормальном состоянии популяция резидентных макрофагов печени млекопитающих, в том числе у крыс, представлена практически исключительно потомками гемопоэтических клеток желточного мешка [6, 16, 17]. Для анализа иммунофенотипа макрофагов был использован ряд маркеров. Наиболее часто для выявления тканевых макрофагов используются антитела к белку CD68 [7, 9]. CD 68 (макросиалин) представляет собой интегральный трансмембранный белок, участвующий в фагоцитарной активности, а также в работе лизосомального аппарата клетки [7, 9]. При анализе экспрессии CD68 в печени

крыс в норме установлено, что примерно 20% клеток в поле зрения приходится на CD68+ клетки (рис. 1 а), что согласуется с нашими более ранними исследованиями [4]. Количество CD163+ (18%) и CD206+ (19%) клеток примерно совпадало с количеством CD68+ макрофагов, в то время как CD86+ макрофагов было значительно меньше (10%) (рис. 1 б, в, рис. 2).

Стоит также отметить особенность распределения сигнала от CD163 в пределах клеток Купфера. Если CD68, CD206 и CD86 локализовались преимущественно в перинуклеарной области клетки, то сигнал от CD163 детектировался с одинаковой интенсивностью вдоль всего макрофага. При этом именно по сигналу от CD163 выявляется тесная связь резидентных макрофагов и синусоидов печени (рис. 1 а, б, в, г).

Указанные маркеры (CD86, CD163, CD206) также участвуют в выполнении ряда функций макрофагов. CD86 необходим для активации, пролиферации, продукции цитокинов, дифференциации Т-лимфоцитов [3], CD163 участвует в распознавании бактерий и запуске местных реакций воспаления, утилизации гемоглобина [5], CD206 необходим для связывания, эндоцитоза и метаболизма ряда цитокинов, гормонов, а также веществ бактериального происхождения [12].

Помимо специфических функций считается, что рецепторы CD163 и CD206 являются маркерами М2-прорегенераторных, а CD86 – М1-провоспалительных макрофагов [12]. На основании полученных данных мож-

но заключить, что клетки Купфера печени экспрессируют преимущественно маркеры М2-фенотипа, что отчасти подтверждает представление, в соответствии с которым резидентные макрофаги выполняют функции М2-макрофагов [8], а также согласуются с ранее полученными нами данными [1, 2, 10]. Однако часть клеток Купфера несла маркер М1-фенотипа – CD86. В связи с этим невозможно строго отнести резидентные макрофаги к М2-макрофагам, что согласуется со взглядами некоторых авторов, считающих что между М1- и М2-макрофагами существует ряд промежуточных фенотипических форм [11, 14, 15].

### Заключение

Таким образом, в нормальных условиях популяция резидентных макрофагов печени крыс представлена клетками с выраженной экспрессией CD163 и CD206. Это позволяет предположить, что клетки Купфера близки по фенотипу к М2-прорегенераторным макрофагам. Однако выявление CD86<sup>+</sup> резидентных макрофагов свидетельствует о наличии М1-макрофагов, или о присутствии в печени крыс в норме макрофагов с промежуточным между М1- и М2-фенотипом. Высокий уровень экспрессии CD163 и CD206 свидетельствует не только о прорегенераторных свойствах клеток Купфера, но также о тесной связи макрофагов с функциями печени.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Финансирование

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Соглашение № 17-04-01669\17).

### Список литературы / References

1. Лохонина А.В., Покусаев А.С., Арутюнян И.В., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Еремина И.З., Суворцев В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Характеристика иммунофенотипа резидентных макрофагов печени и профиля экспрессируемых генов. Клиническая и экспериментальная морфология. 2018; 1(25): 49–60 [Lokhonina A.V., Pokusaev A.S., Arutyunyan I.V., Elchaninov A.V., Makarov A.V., Eremina I.Z., Surovtsev V.V., Bolshakova G.B., Goldshtein D.V., Fatkhudinov T.Kh. Characteristics of the immunophenotype of the resident macrophages of the liver and profile of expressed genes. Clinical and Experimental Morphology. 2018; 1(25): 49–60] (in Russian).
2. Лохонина А.В., Ельчанинов А.В., Арутюнян И.В., Покусаев А.С., Макаров А.В., Еремина И.З., Суворцев В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фатхудинов Т.Х. Морфофункциональная характеристика макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения. Гены и Клетки. 2018; 13(2): 56–62 [Lokhonina A.V., Elchaninov A.V., Arutyunyan I.V., Pokusaev A.S., Makarov A.V., Eremina I.Z., Surovtsev V.V., Bolshakova G.B., Goldshtein D.V., Fatkhudinov T.Kh. Morphofunctional characteristic of macrophages of embryonic and monocytic origin. Genes & Cells. 2018; 13(2): 56–62] (in Russian). doi: 10.23868/201808020
3. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat. Rev. Immunol. 2013; 13: 227–42. doi: 10.1038/nri3405
4. Elchaninov AV, Fatkhudinov TK, Usman NY, et al. Dynamics of macrophage populations of the liver after subtotal hepatectomy in rats. BMC Immunol. 2018; 19: 23. doi: 10.1186/s12865-018-0260-1.
5. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. Blood. 2009; 113: 887–92. doi: 10.1182/blood-2008-07-167064
6. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate map analysis reveals that adult mice derive from primitive macrophages. Science. 2010; 330: 841–5. doi: 10.1126/science.1194637
7. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, et al. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. Scand. J. Immunol. 2008; 67: 453–63. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02091.x
8. Williams M, Scott CL. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? Nat. Rev. Immunol. 2017; 17: 451–60. doi: 10.1038/nri.2017.42
9. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood. 1993; 81: 1607–13.
10. Lokhonina A, Elchaninov A, Fatkhudinov T, et al. Activated Macrophages of Monocytic Origin Predominantly Express Proinflammatory Cytokine Genes, Whereas Kupffer Cells Predominantly Express Anti-Inflammatory Cytokine Genes. Biomed Res. Int. 2019; 2019: 1–13. doi: 10.1155/2019/3912142
11. Malyshev I, Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. Biomed Res. Int. 2015; 2015: 1–22. doi: 10.1155/2015/341308
12. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014; 6: 13. doi: 10.12703/P6-13
13. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. J. Leukoc. Biol. 2012; 92: 1177–86. doi: 10.1189/jlb.0512231
14. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity. 2014; 41: 14–20. doi: 10.1016/j
15. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. Front. Immunol. 2019; 10: 1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084
16. Perdiguer EG. Development and maintenance of resident macrophages. Nat Immunol. 2016; 17: 2–8.
17. Perdiguer GE, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. Nature. 2015; 518: 547–51. doi: 10.1038/nature13989

18. Theret M, Mounier R, Rossi F. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. *Development*. 2019; 146: dev156000. doi: 10.1242/dev.156000

---

Поступила в редакцию 7.07.2019  
Принята в печать 17.09.2019

Received 7.07.2019  
Accepted 17.09.2019

---

*Для цитирования:* Ельчанинов А.В., Лохонина А.В., Макаров А.В., Вишнякова П.А., Кананыхина Е.Ю., Никитина М.П., Гринберг М.В., Быков А.В., Чарьева И.Г., Большакова Г.Б., Фатхудинов Т.Х. Фенотипический полиморфизм клеток Купфера печени крыс в норме. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(3): 35–39. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-35-39

*For citation:* El'chaninov A.V., Lokhonina A.V., Makarov A.V., Vishnyakova P.A., Kananykhina E.Yu., Nikitina M.P., Grinberg M.V., Bykov A.V., Charyeva I.G., Bol'shakova G.B., Fatkhudinov T.Kh. Phenotypic polymorphism of normal rat liver Kupffer cells. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019; 8(3): 35–39. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-35-39

---