

АНГИОГЕНИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕДИАТОР ФИБРОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МАКРОФАГОВ

А.А.Максимова¹, Е.Я.Шевела¹, М.А.Тихонова¹,
Т.В.Тыринова¹, С.С.Богачев², А.А.Останин¹, Е.Р.Черных¹

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, РФ; ²ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, РФ

Изучали продукцию ангиогенина макрофагами человека и определяли роль данного фактора в фибромодулирующей активности макрофагов. Все исследуемые подтипы макрофагов активно продуцировали ангиогенин, особенно макрофаги, поляризованные эффероцитозом, — M2(LS). Экзогенный рекомбинантный ангиогенин дозозависимо усиливал пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы. Добавление в культуры фибробластов ингибитора ангиогенина подавляло стимулирующий эффект экзогенного ангиогенина и кондиционных сред M2(LS). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении ангиогенина в опосредованную макрофагами паракринную регуляцию фибробластов кожи.

Ключевые слова: ангиогенин; макрофаги; фибробласты; репарация

Исследования последних лет убедительно доказывают важнейшую роль макрофагов в регуляции процессов воспаления и репарации. Было показано, что пластичность макрофагов позволяет им последовательно изменять свой функциональный фенотип во время ранозаживления [1]. Они играют важную роль в паракринной регуляции фибробластов, продуцируя ростовые факторы с фибромодулирующей активностью (включая TGF β , FGF, PDGF, а также VEGF, обладающий проангиогенной активностью) [2].

Одним из продуктов секрета макрофагов является ангиогенин — многофункциональный белок, участвующий в модуляции большого количества патофизиологических процессов, включая онкогенез, воспаление, аутоиммунитет, репродукцию, нейропротекцию, регенерацию повреждённых тканей [3,4]. Он оказывает противовоспалительное и мощное проангиогенное действие, регулирует рост, апоптоз и

дифференцировку клеток [4,5]. Функциональная активность ангиогенина в значительной степени определяет течение и разрешение раневого процесса [6,7].

Ранее нами показано, что M2-макрофаги, фенотип которых индуцирован взаимодействием с апоптотическими клетками (M2(LS, Low Serum)), проявляют выраженные профиброгенные свойства, активно стимулируют пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы [8], однако вклад ангиогенина в данный эффект неясен.

Целью данной работы являлось изучение продукции ангиогенина различными функциональными фенотипами макрофагов человека и возможной роли этого фактора в опосредовании фибромодулирующей активности макрофагов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Макрофаги генерировали из моноцитов периферической крови 10 здоровых доноров в возрасте 22-48 лет, как указано в работе [8]. Забор крови и все исследования проведены после получения

Адрес для корреспонденции: parkinson.dses@gmail.com.
Максимова А.А.

DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-5-

информированного согласия в соответствии с протоколом, утверждённым этическим комитетом НИИФКИ. Линия дермальных фибробластов NAF1 предоставлена ЦКП "Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления" ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Рекombинантный ангиогенин предоставлен компанией ООО "Лаборатория Ангиофарм" (Новосибирск).

Уровень ангиогенина в супернатантах макрофагов определяли с помощью ИФА (ELISA kit; R&D System). Пролиферативный уровень фибробластов оценивали в присутствии/отсутствии ангиогенина (10, 50, 100, 200 нг/мл) или TGF- β 1 (20 нг/мл; R&D System) на 5-й день с помощью WST-теста в соответствии с инструкцией производителя. Эксперимент с ингибированием ангиогенина проводили с использованием 200 нг/мл неомидина ("Агрофарм").

Дифференцировку фибробластов определяли на 5-й день в присутствии/отсутствии ангиогенина или TGF- β 1 (20 нг/мл) по уровню внутриклеточной экспрессии альфа-гладкомышечного актина (α -SMA) с помощью проточной цитометрии (антитела к α -SMA; R&D Systems).

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (Q1; Q3). Значимость различий рассчитывали с помощью критерия Вилкоксона для парных выборок при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе был проведён анализ продукции ангиогенина макрофагами человека (рис. 1). Макрофаги продуцировали ангиогенин на хорошо детектируемом уровне, при этом M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex) характеризовались сопоставимым уровнем продукции (1730, 1220 и 1160 пг/мл соответственно), в то время как M2(LS), поляризованные в M2-направлении в результате эффероцитоза, отличались значимо более высоким уровнем продукции ангиогенина. Его содержание в культуральных супернатантах достигало 4730 пг/мл и более чем в 2.7 раза превышало уровень продукции данного фактора другими функциональными фенотипами (как M1, так и M2). Продукция ангиогенина дермальными фибробластами NAF1 была существенно ниже (280 пг/мл).

Ранее вклад ангиогенина в репаративный процесс преимущественно связывали с его

мощным проангиогенным действием [9], поэтому сначала необходимо было оценить влияние экзогенного ангиогенина на функциональную активность фибробластов дермы. Мы проанализировали действие различных концентраций рекombинантного ангиогенина на пролиферативный ответ фибробластов и обнаружили концентрационно-зависимый стимулирующий эффект на пролиферацию NAF1, который исчезал при высоких концентрациях (200 нг/мл) (рис. 2, а). Более того, в концентрации 50 нг/мл стимулирующее влияние ангиогенина превышало эффект TGF- β 1 (20 нг/мл), используемого в качестве позитивного контроля.

На следующем этапе мы оценивали влияние рекombинантного ангиогенина на дифференцировку фибробластов. α -SMA является одним из ключевых маркеров миофибробластов — основных клеток, продуцирующих внеклеточный матрикс и играющих ведущую роль в ранозаживлении [10]. Увеличение клеток, экспрессирующих данный белок, косвенно может свидетельствовать о стимулирующем влиянии ангиогенина на процесс дифференцировки фибробластов. Рекombинантный ангиогенин в концентрации 50 нг/мл способствовал увеличению количества α -SMA-экспрессирующих клеток в культурах NAF1 по сравнению с уровнем спонтанной дифференцировки фибробластов (63.5% против 55%), однако максимальный стимулирующий эффект ангиогенина при этом не достигал значений TGF β -индуцированного (позитивного) контроля (80.5%) (рис. 2, б).

На завершающем этапе был исследован вклад ангиогенина в пролиферативную

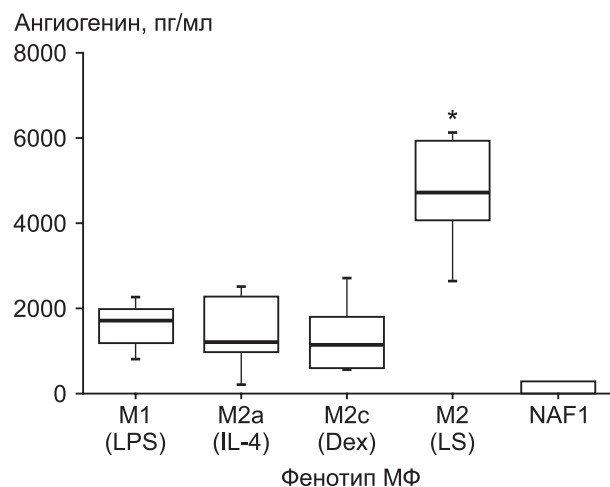


Рис. 1. Содержание ангиогенина в супернатантах функциональных фенотипов макрофагов.

* $p < 0.05$ по сравнению с M1(LPS), M2a(IL-4) и M2c(Dex). $N=7$.

активность M2(LS). Неомидин — ингибитор ангиогенина [11], блокирующий его ядерную транслокацию в клетке. Мы показали значительное снижение эффекта кондиционных сред M2(LS) на пролиферативный ответ NAF1 в присутствии неомидина (до 30%) (рис. 3, б), что свидетельствует о наличии ангиогенинзависимых путей влияния макрофагов на пролиферацию фибробластов дермы. При этом неомидин не снижал уровень спонтанной пролиферативной активности фибробластов (рис. 3, а), несмотря на то что клетки NAF1 способны самостоятельно продуцировать ангиогенин.

Полученные нами данные свидетельствуют о чувствительности клеточной линии дермальных фибробластов NAF1 к ангиогенину и согласуются с исследованиями, продемонстрировавшими положительные корреляционные связи между концентрацией ангиогенина и активностью пролиферации и экспрессии белка α -SMA в фибробластах конъюнктивы и птериgiuma [12], а также с работой, показавшей важное значение ангиогенина для миграции и инвазии фибробластов предстательной железы [13]. В то же время работы [12,13] ограничены исследованием эндогенного ангиогенина,

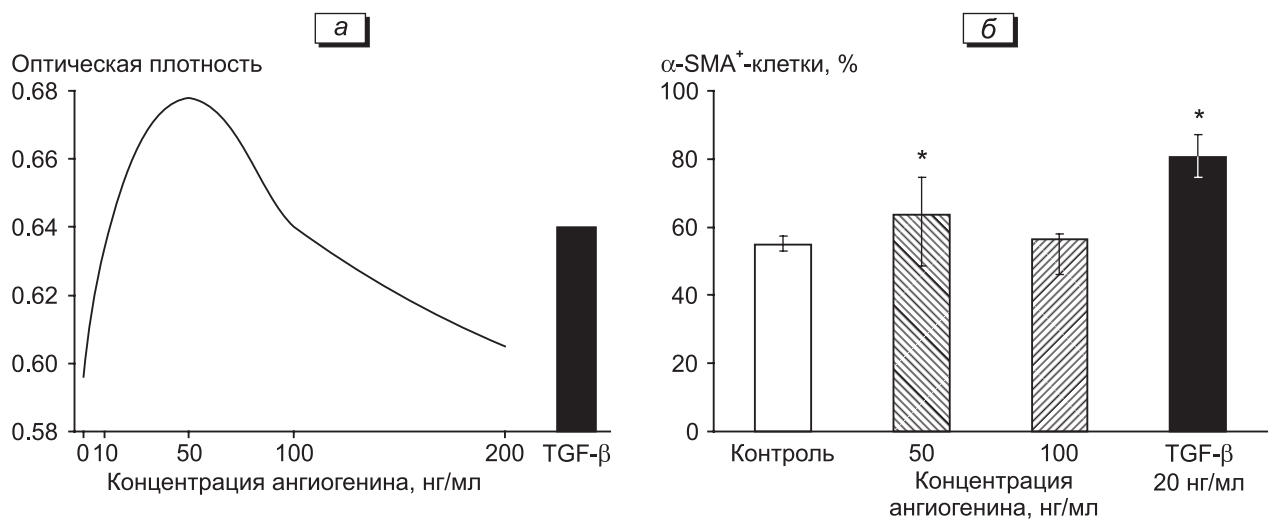


Рис. 2. Влияние рекомбинантного ангиогенина на функциональную активность дермальных фибробластов линии NAF1.

а — пролиферативная активность фибробластов (WST-тест); количество экспериментов $n=4-5$. б — доля α -SMA⁺-клеток в культурах NAF1, обработанных рекомбинантным ангиогенином; количество экспериментов $n=4$. * $p<0.05$ по сравнению с контролем.

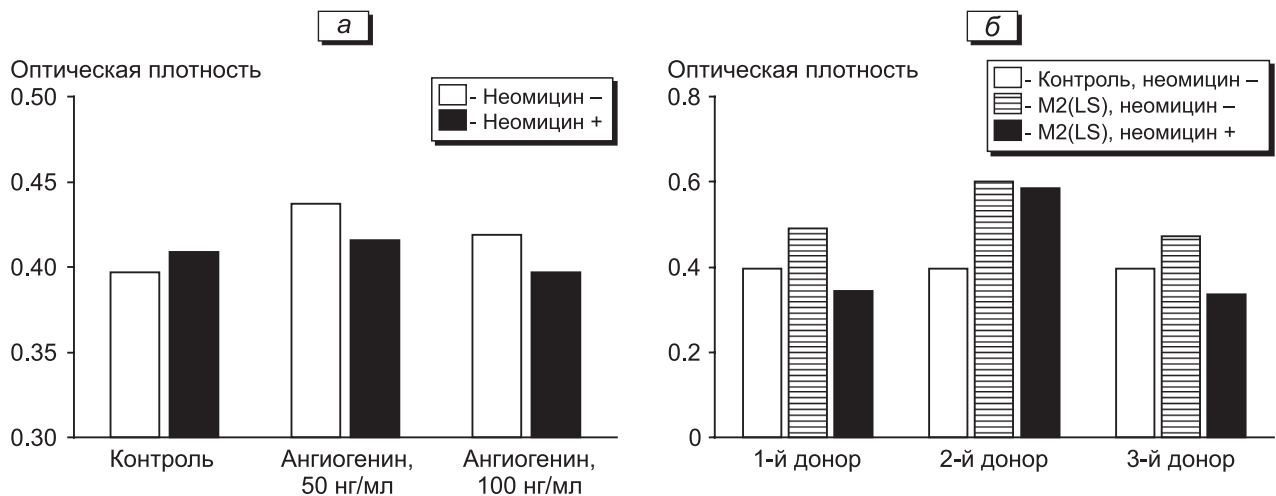


Рис. 3. Влияние неомидина на пролиферативную активность дермальных фибробластов линии NAF1 (WST-тест), стимулированных ангиогенином (в триплетах) (а) и кондиционными средами M2(LS) (б).

вырабатываемого фибробластами, тогда как полученные нами результаты демонстрируют прямой стимулирующий эффект экзогенного ангиогенина на активность фибробластов дермы. Интересно также, что в более высоких концентрациях (250-1000 нг/мл) ангиогенин, по-видимому, способен оказывать защитное действие против образования рубцов, снижая пролиферацию фибробластов и секрецию ими TGF- β 1, как показано в работе [14]. Мы также не обнаружили стимулирующего эффекта ангиогенина в концентрации 200 нг/мл на пролиферативный ответ фибробластов. Эти данные свидетельствуют о разностороннем влиянии рекомбинантного ангиогенина на функциональную активность дермальных фибробластов, которое, по-видимому, определяется концентрацией фактора.

Таким образом, макрофаги человека продуцируют ангиогенин в гораздо больших концентрациях по сравнению с дермальными фибробластами, причём наиболее высокий уровень продукции характерен для M2(LS), поляризация которых связана с эффероцитозом и для которых ранее нами была продемонстрирована выраженная профиброгенная активность. При этом блокирование ангиогенина с помощью неомидина снижает пролиферативный эффект экзогенного ангиогенина и кондиционных сред M2(LS), не оказывая влияния на спонтанную пролиферативную активность фибробластов. Это позволяет предположить, что относительно низкий уровень эндогенной продукции ангиогенина фибробластами не играет значимой роли в поддержании пролиферации фибробластов линии NAF1 в культуре *in vitro*, в то время как более высокие концентрации ангиогенина, содержащиеся в супернатантах M2(LS), опосредуют стимулирующий эффект макрофагов на пролиферацию фибробластов. Таким образом, ангиогенин является важным медиатором паракринной регуляции, осуществляемой макрофагами в отношении фибробластов.

Авторы выражают благодарность А.А.Пуртову (ООО "Лаборатория Ангиофарм", Новосибирск) за предоставление рекомбинантного человеческого ангиогенина.

Работа выполнена в рамках НИР (государственная регистрация № 122011800324-4).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Witherell C.E., Abebayehu D., Barker T.H., Spiller K.L.* Macrophage and fibroblast interactions in biomaterial-mediated fibrosis // *Adv. Healthc Mater.* 2019. Vol. 8, N 4. ID e1801451. doi: 10.1002/adhm.201801451
2. *Pakshir P., Hinz B.* The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication // *Matrix Biol.* 2018. Vol. 68-69. P. 81-93. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.019
3. *Poto R., Loffredo S., Palestra F., Marone G., Patella V., Varricchi G.* Angiogenesis, lymphangiogenesis, and inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): few certainties and many outstanding questions // *Cells.* 2022. Vol. 11, N 10. ID 1720. doi: 10.3390/cells11101720
4. *Sheng J., Xu Z.* Three decades of research on angiogenin: a review and perspective // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2016. Vol. 48, N 5. P. 399-410. doi: 10.1093/abbs/gmv131
5. *Lee S.H., Kim K.W., Min K.M., Kim K.W., Chang S.I., Kim J.C.* Angiogenin reduces immune inflammation via inhibition of TANK-binding kinase 1 expression in human corneal fibroblast cells // *Mediators Inflamm.* 2014. Vol. 2014. ID 861435. doi: 10.1155/2014/861435
6. *Yurina N.V., Ageeva T.A., Goryachkin A.M., Varaksin N.A., Ryabicheva T.G., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Romashchenko A.V., Proskurina A.S., Bogachev S., Purto A.V.* Effects of recombinant angiogenin on collagen fiber formation and angiogenesis in the dermis of wistar rats // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2021. Vol. 14. P. 187-196. doi: 10.2147/CCID.S294825
7. *Cucci L.M., Satriano C., Marzo T., La Mendola D.* Angiogenin and copper crossing in wound healing // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N 19. ID 10704. doi: 10.3390/ijms221910704
8. *Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р.* Влияние секрета различных функциональных фенотипов макрофагов на пролиферацию, дифференцировку и коллагенпродуцирующую активность дермальных фибробластов *in vitro* // *Бюл. exper. биол.* 2021. Т. 171, № 1. С. 64-68. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-1-64-68
9. *Singh K., Maity P., Koroma A.K., Basu A., Pandey R.K., Vander Beken S., Haas P., Krug L., Hainzl A., Sindrilaru A., Pfeiffer C., Wlaschek M., Frank N.Y., Frank M.H., Ganss C., Bánvölgyi A., Wikonkál N., Eming S., Pastar I., Tomic-Canic M., Kluth M.A., Scharffetter-Kochanek K.* Angiogenin released from ABCB5⁺ stromal precursors improves healing of diabetic wounds by promoting angiogenesis // *J. Invest. Dermatol.* 2022. Vol. 142, N 6. P. 1725-1736. doi: 10.1016/j.jid.2021.10.026
10. *D'Urso M., Kurniawan N.A.* Mechanical and physical regulation of fibroblast-myofibroblast transition: from cellular mechanoresponse to tissue pathology // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. ID 609653. doi: 10.3389/fbioe.2020.609653
11. *Hu G.F.* Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95, N 17. P. 9791-9795. doi: 10.1073/pnas.95.17.9791

12. Kim K.W., Park S.H., Wee S.W., Kim J.C. Overexpression of angiogenin in pterygium body fibroblasts and its association with proliferative potency // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. Vol. 54, N 9. P. 6355-6362. doi: 10.1167/iovs.13-12141
13. Jones M.L., Ewing C.M., Isaacs W.B., Getzenberg R.H. Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts // J. Cell. Mol. Med. 2012. Vol. 16, N 1. P. 193-201. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01283.x
14. Pan S.C., Lee C.H., Chen C.L., Fang W.Y., Wu L.W. Angiogenin attenuates scar formation in burn patients by reducing fibroblast proliferation and Transforming Growth Factor β 1 secretion // Ann. Plast. Surg. 2018. Vol. 80, N 2S, Suppl. 1. P. S79-S83. doi: 10.1097/SAP.0000000000001306

Получено 20.12.22
