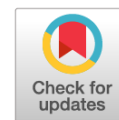


DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.681777>

EDN: YIPDKS



# Экспрессия генов цитокинов и ранозаживляющий потенциал макрофагов, полученных из красного костного мозга и периферической крови крыс

В.В. Киселева<sup>1,2</sup>, П.А. Вишнякова<sup>1,2</sup>, И.С. Цветков<sup>3</sup>, А.В. Ельчанинов<sup>1,2,3</sup>, А.М. Косырева<sup>1,3</sup>, Т.Х. Фатхудинов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Макрофаги — ключевые регуляторы воспаления и регенерации, представляющие интерес для клеточной терапии. У крыс особенности функциональной активности макрофагов (МФ), зависящие от их происхождения — из красного костного мозга (ККМ) или периферической крови (ПК), — остаются малоизученными, особенно в контексте заживления ран, где важную роль играет превращение аминокислоты L-аргинина.

**Цель исследования** — сравнить уровни экспрессии генов регуляторных и провоспалительных цитокинов (*IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*) и генов ферментов превращения аминокислоты L-аргинина (*Arg1* и *NOS2*) в макрофагах, полученных из моноцитарных предшественников красного костного мозга и из моноцитов периферической крови, а также оценить их влияние на заживление ран кожи.

**Методы.** Получение МФ из моноцитарных предшественников ККМ и моноцитов ПК крыс линии Sprague-Dawley с использованием rM-CSF (recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor). Иммуоцитохимическая оценка фенотипа МФ (окрашивание на маркеры CD68 и CD43). Определение уровней экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени и нормализация относительно гена  $\beta 2$ -микроглобулина (*β2M*). Изучение влияния макрофагов на заживление ран кожи *in vivo*. Статистический анализ с использованием критерия Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

**Результаты.** МФ из обоих источников экспрессировали маркеры CD68 и CD43. В МФ-ККМ выявлен высокий уровень экспрессии генов *IL-6* и *IL-10* ( $p = 0,029$ ,  $p = 0,027$  соответственно); в МФ-ПК — высокий уровень экспрессии генов *Arg1* и *NOS2* ( $p = 0,029$  для обоих генов). Введение МФ-ПК не вызывало осложнений, тогда как введение МФ-ККМ сопровождалось кровоточивостью ран. Ускорения темпов заживления ран не наблюдали.

**Заключение.** МФ-ККМ характеризуются повышенной способностью к активации, тогда как МФ-ПК оказывают выраженное влияние на регенерацию тканей. Для клеточной терапии предпочтительным является использование МФ-ПК ввиду меньшего риска развития осложнений. Полученные данные подчёркивают важность дальнейшего изучения зависимости активности макрофагов в репаративных процессах от источника их получения.

**Ключевые слова:** макрофаги; ПЦР в реальном времени; модель раны; L-аргинин; клеточная терапия; цитокины; поляризация макрофагов.

## Как цитировать:

Киселева В.В., Вишнякова П.А., Цветков И.С., Ельчанинов А.В., Косырева А.М., Фатхудинов Т.Х. Экспрессия генов цитокинов и ранозаживляющий потенциал макрофагов, полученных из красного костного мозга и периферической крови крыс // Морфология. 2026. Т. 164, № 2. С. 221–234. DOI: 10.17816/morph.681777 EDN: YIPDKS

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.681777>

EDN: YIPDKS

# Gene Expression of Cytokines and Wound-Healing Potential of Macrophages Derived From Rat Bone Marrow and Peripheral Blood

Viktoriiia V. Kiseleva<sup>1,2</sup>, Polina A. Vishnyakova<sup>1,2</sup>, Ivan S. Tsvetkov<sup>3</sup>, Andrey V. Elchaninov<sup>1,2,3</sup>, Anna M. Kosyreva<sup>1,3</sup>, Timur Kh. Fatkhutdinov<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Macrophages are key regulators of inflammation and tissue regeneration and represent a promising tool for cell therapy. In rats, functional differences between macrophages derived from red bone marrow and peripheral blood remain insufficiently studied, particularly in the context of wound healing, where L-arginine metabolism plays a critical role.

**AIM:** To compare the expression levels of regulatory and proinflammatory cytokine genes (*interleukin-1 $\beta$* , *-6*, and *-10*) and genes encoding L-arginine-metabolizing enzymes (*Arg1* and *NOS2*) in macrophages derived from bone marrow monocyte precursors and peripheral blood monocytes, and to assess their effects on cutaneous wound healing.

**METHODS:** Macrophages were generated from red bone marrow monocyte precursors and peripheral blood monocytes of Sprague–Dawley rats using recombinant macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF). Macrophage phenotype was established using immunocytochemistry (staining for CD68 and CD43 markers). Gene expression levels were determined by real-time polymerase chain reaction and normalized to  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M). The effects of macrophages on cutaneous wound healing were evaluated *in vivo*. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney *U* test ( $p < 0.05$ ).

**RESULTS:** Macrophages from both sources expressed CD68 and CD43. Red bone marrow (RBM)–derived macrophages demonstrated higher expression levels of *IL-6* and *IL-10* genes ( $p = 0.029$  and  $p = 0.027$ , respectively), whereas peripheral blood (PB)–derived MPs showed higher expression of *Arg1* and *NOS2* ( $p = 0.029$  for both genes). Administration of PB-derived macrophages did not result in complications, whereas RBM-derived macrophages were associated with wound bleeding. No accelerated wound healing was observed in either group.

**CONCLUSION:** RBM-derived macrophages exhibit enhanced activation potential, whereas PB-derived macrophages demonstrate a more pronounced influence on tissue regeneration. For cell-based therapy, PB-derived macrophages appear preferable due to a lower risk of complications. These findings highlight the importance of further investigation into the source-dependent activity of macrophages in reparative processes.

**Keywords:** macrophages; real-time PCR; wound model; L-arginine; cell therapy; cytokines; macrophage polarization.

## To cite this article:

Kiseleva VV, Vishnyakova PA, Tsvetkov IS, Elchaninov AV, Kosyreva AM, Fatkhutdinov TKh. Gene Expression of Cytokines and Wound-Healing Potential of Macrophages Derived From Rat Bone Marrow and Peripheral Blood. *Morphology*. 2026;164(2):221–234. DOI: 10.17816/morph.681777 EDN: YIPDKS

Submitted: 31.05.2025

Accepted: 15.09.2025

Published online: 15.01.2026

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.681777>

EDN: YIPDKS

# 大鼠红骨髓和外周血来源巨噬细胞的细胞因子基因表达和伤口愈合潜能

Viktorii V. Kiseleva<sup>1,2</sup>, Polina A. Vishnyakova<sup>1,2</sup>, Ivan S. Tsvetkov<sup>3</sup>, Andrey V. Elchaninov<sup>1,2,3</sup>, Anna M. Kosyreva<sup>1,3</sup>, Timur Kh. Fatkhutdinov<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

## 摘要

**论证。**巨噬细胞是炎症和再生过程中的关键调节因子，因此在细胞治疗领域备受关注。在大鼠中，巨噬细胞（MF）的功能活性取决于其来源——红骨髓（BM）或外周血（PB）——仍知之甚少，尤其是在伤口愈合方面，氨基酸 L-精氨酸的转化在其中发挥着重要作用。

**目的。**本研究旨在比较源自红骨髓单核细胞前体和外周血单核细胞的巨噬细胞中编码调节性和促炎细胞因子（IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10）的基因以及编码氨基酸 L-精氨酸转化酶（Arg1 和 NOS2）的基因的表达水平，并评估它们对皮肤伤口愈合的影响。

**方法。**使用重组巨噬细胞集落刺激因子（rM-CSF）从 Sprague-Dawley 大鼠的红骨髓单核细胞前体及外周血单核细胞中获取巨噬细胞。采用免疫细胞化学方法评估巨噬细胞的表型（CD68 和 CD43 标记染色）。通过实时 PCR 测定基因表达水平，并以  $\beta$ 2-微球蛋白（ $\beta$ 2M）基因进行标准化。研究巨噬细胞对体内皮肤伤口愈合的影响。采用 Mann-Whitney 检验进行统计分析（ $p < 0.05$ ）。

**结果。**两种来源的巨噬细胞均表达CD68和CD43标记。在红骨髓来源的巨噬细胞（BM-M $\Phi$ ）中，IL-6 和 IL-10 基因表达水平较高（ $p = 0.029$ ； $p = 0.027$ ）；在外周血来源的巨噬细胞（PB-MF）中，Arg1 和 NOS2 基因表达水平较高（两个基因的  $p = 0.029$ ）。外周血来源巨噬细胞（PB-MF）的移植未引起并发症，而红骨髓来源巨噬细胞（BM-MF）的移植则伴有伤口出血。未观察到伤口愈合加速。

**结论。**红骨髓来源巨噬细胞（BM-MF）具有更强的活化潜能，而外周血来源巨噬细胞（PB-M $\Phi$ ）则对组织再生有显著影响。由于并发症风险较低，PB-MF 更适用于细胞治疗。所得数据强调了进一步研究巨噬细胞活性在修复过程中对其来源依赖性的重要性。

**关键词：**巨噬细胞；实时 PCR；伤口模型；L-精氨酸；细胞治疗；细胞因子；巨噬细胞极化。

## To cite this article:

Kiseleva VV, Vishnyakova PA, Tsvetkov IS, Elchaninov AV, Kosyreva AM, Fatkhutdinov TKh. 大鼠红骨髓和外周血来源巨噬细胞的细胞因子基因表达和伤口愈合潜能. *Morphology*. 2026;164(2):221–234. DOI: 10.17816/morph.681777 EDN: YIPDKS

收到: 31.05.2025

接受: 15.09.2025

发布日期: 15.01.2026

## ОБОСНОВАНИЕ

Макрофаги относятся к клеткам врождённого иммунитета и представляют большой интерес для исследователей ввиду их участия в физиологических и патологических процессах, таких как острый респираторный дистресс синдром, преэклампсия, длительное заживление ран, атеросклероз и других [1–6]. Макрофаги (МФ) играют ключевую роль в воспалительных процессах и регенерации тканей [7]. Участие в полярно направленных процессах является характерной особенностью данного типа клеток и обозначается термином пластичность. Поляризация МФ в про- или противовоспалительный фенотип — это комплексная реакция клеток на микроокружение, включающая не только изменения на генном уровне, но и перестройку метаболизма, в частности путей превращения аминокислоты L-аргинина, необходимой для синтеза белков, нуклеотидов и полиаминов [8].

Для подавления бактериальных инфекций и усиления воспаления провоспалительные МФ выделяют большое количество оксида азота (NO), образующегося из L-аргинина под действием фермента индуцибельной синтазы оксида азота (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS или NOS2) [9]. Стимуляция синтеза коллагена, формирования новой соединительной ткани и ангиогенеза противовоспалительными МФ ассоциирована с высоким уровнем аргиназы-1 (Arg1). Баланс активности NOS2 и Arg1 в метаболических путях превращения L-аргинина определяет эффективность регенерации тканей и зависит от поляризации МФ [10].

Известно, что на начальных этапах после повреждения целостности кожных покровов (фаза воспаления) основная функция МФ заключается в инициации воспалительной реакции, что достигается за счёт выработки NO и цитокинов, включая интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и другие. В то же время МФ посредством фагоцитоза очищают рану от погибших клеток и микроорганизмов, способствуя тем самым подготовке среды для регенерации. По мере развития процесса заживления раны (фаза пролиферации) в МФ активируются механизмы, приводящие к секреции факторов роста — VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), — стимулирующих ангиогенез и активирующих фибробласты. Дисбаланс двух состояний МФ (про- и противовоспалительного) в пролиферативную фазу регенерации приводит к хроническому воспалению, либо к избыточному рубцеванию. В дальнейшем, на этапе ремоделирования раны адекватное функционирование МФ позволяет избежать фиброза или несостоятельности рубца [6].

Таким образом, использование МФ в качестве клеточной терапии у человека, в том числе при нарушениях, связанных с физиологическим заживлением ран, имеет значительный потенциал [11].

Подходящим модельным объектом для оценки возможности применения МФ для клеточной терапии таких патологий, как острые и хронические раны, являются крысы. Их преимуществами являются относительно крупные размеры и простота обращения, а также то, что, в отличие от мышей, у крыс имеются два источника макрофагов: красный костный мозг (ККМ) и периферическая кровь (ПК). Особенностью использования ККМ в качестве источника МФ является возможность получения большего количества клеток, чем из ПК. Однако для выделения ККМ необходимо вывести животное из эксперимента, а применение таких МФ может привести к активации иммунной системы у реципиента, несмотря на линейность животных. Альтернативным источником получения МФ служит периферическая кровь, при этом животное остаётся в эксперименте и может быть использовано для аутологичного введения МФ, что значительно снижает количество животных в исследовании [12, 13].

Для человека показано, что неполяризованные МФ, культивированные из периферической крови и красного костного мозга, обладают сходным фенотипом и фагоцитарной активностью [12]. Однако для крыс область прямых сравнительных исследований уровней экспрессии генов и влияния МФ, выделенных из разных источников, на процесс заживления ран остаётся малоизученной. Большинство данных получено в результате межвидовых сравнений или сфокусировано на отдельных субпопуляциях, например, перитонеальных макрофагах.

**Цель исследования** — сравнить уровни экспрессии генов регуляторных и провоспалительных цитокинов (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10*) и генов ферментов превращения аминокислоты L-аргинина (*Arg1* и *NOS2*) в макрофагах, полученных из моноцитарных предшественников красного костного мозга и из моноцитов периферической крови, а также оценить их влияние на заживление ран кожи.

## МЕТОДЫ

### Дизайн исследования

Для подтверждения гипотезы о различиях макрофагов, полученных из двух источников, по уровням экспрессии генов *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10*, *Arg1*, *NOS2*, а также по их влиянию на заживление ран кожи проведено экспериментальное подтверждающее исследование в параллельных группах. Животных включали в исследование методом случайного отбора с последующей простой рандомизацией по группам.

Для *in vitro* исследования выделяли макрофаги из периферической крови и красного костного мозга; сравнивали уровни экспрессии генов *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-10*, *Arg1*, *NOS2* в них, а также экспрессию маркеров CD68, CD45 и CD34. Перед проведением *in vivo* эксперимента животных случайным образом разделили на 3 группы

по 3 особи в каждой. Проведено подтверждающее экспериментальное неослепленное исследование в параллельных группах.

### Критерии отбора и содержание животных

Исследование проведено на 12 самцах крыс линии Sprague-Dawley, полученных из питомника Филиала ИБХ РАН (Пушино, Россия): масса ( $250 \pm 30$ ) г, возраст 6 месяцев. Животных содержали в стандартных полипропиленовых клетках (по 4 особи в каждой) в помещениях с контролируемой температурой ( $20 \pm 2$ ) °C и относительной влажностью воздуха 40–60%, при обратном цикле свет/темнота (12/12 ч). Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму (ПК-120-1, 000 «Лабораторснаб», Россия). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и её пересмотренным вариантом 2000 г., а также с рекомендациями ARRIVE и Директивой ЕС 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях [13]. Для эвтаназии применяли передозировку изофлурана (Laboratories Karizoo S.A., Испания) с использованием испарителя Matrix VIP3000 (Baxter, Германия).

### Экспериментальное воздействие

У 3-х животных после эвтаназии выделяли моноциты из красного костного мозга; 9 крысам моделировали послынную эксцизионную рану кожи в области спины. За 7 дней до моделирования раны у трёх животных проводили забор периферической крови из хвостовой вены под глубоким инъекционным наркозом, индуцированным внутримышечным введением смеси тилетамина и золазепам (Virbac, Франция) в дозе 30 мг/кг. Каждое животное маркировали для последующего введения аутологических МФ.

#### Модель послынной эксцизионной раны кожи спины

Полнослынную эксцизионную рану кожи моделировали с использованием стерильного скальпеля в области лопаток, поскольку эта зона свободна от выраженной мышечной активности и характеризуется относительно постоянной толщиной кожного покрова. Сразу после проведения манипуляции трём животным в края раны вводили по  $0,5 \times 10^6$  аутологических МФ, полученных из периферической крови (МФ-ПК), в кондиционированной культуральной среде объёмом 200 мкл. У трёх крыс края раны оставляли интактными — группа контрольных животных. Оставшимся трём животным в края раны вводили МФ, полученные из моноцитарных предшественников, выделенных из красного костного мозга (МФ-ККМ). Клетки вводили с помощью инсулинового шприца с иглой 30G. Вмешательство проводили под действием наркоза, индуцированного внутримышечным введением смеси тилетамина и золазепам

в дозе 30 мг/кг. В послеоперационном периоде анальгетики не применяли; каждую группу животных содержали в отдельной полипропиленовой клетке в стандартных условиях вивария. На 7 и 14 день после формирования раны и введения МФ визуально оценивали её состояние: наличие отёка и гиперемии краёв раны, а также наличие экссудата, его характер и количество (гнойный или гемморрагический). Проводили фотографирование для последующего определения скорости сближения краёв раны с использованием программы ImageJ (v.1.54p) [14].

#### Получение и культивирование макрофагов

Выделение моноцитов ( $n = 3$ ) из красного костного мозга проводили методом градиентного центрифугирования, описанным в работе N. Halimani и соавт. [15]. После отделения бедренных костей удаляли эпифизы, а диафиз промывали раствором Хенкса («ПанЭко», Россия), содержащим 1000 МЕ/мл гепарина (АО «Синтез», Россия). Полученную суспензию центрифугировали (400 г, 30 мин, 20 °C) на градиенте плотности Фиколла ( $1,09 \text{ г/см}^3$ ; «ПанЭко», Россия). Фракцию мононуклеарных клеток отбирали и промывали двукратным центрифугированием в растворе Хенкса (300 г, 20 мин, 20 °C).

При выделении моноцитов из периферической крови для культивирования макрофагов ( $n = 3$ ) клеточную фракцию также получали методом градиентного центрифугирования (400 г, 40 мин, 20 °C, без торможения) на Фиколле, с последующим двукратным промыванием клеток (300 г, 10 мин, 20 °C) в растворе Версена («ПанЭко», Россия).

В обоих случаях после промывания осадок ресуспендировали в соответствующем растворе и оценивали количество и жизнеспособность клеток по включению трипанового синего с использованием анализатора TC20 (Bio-Rad Laboratories, США). Клетки в количестве 2–3 млн ресуспендировали в 3–4 мл полной ростовой среды (ПРС) следующего состава: RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), 10% фетальной телячьей сыворотки (PAA Lab., Австрия), 1% смеси пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия), 1% L-глутамина. Кроме того, в ПРС добавляли 50 нг/мл рекомбинантного макрофаг-колониестимулирующего фактора (rM-CSF; Cloud-Clone, Китай). Получившую суспензию клеток помещали в лунки 6-ти луночного планшета или в чашки Петри ( $\varnothing$  3 см) и культивировали в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ , относительная влажность 95%) в течение 7 дней. На вторые сутки культивирования из культуры убирали клетки, не прикрепившиеся к пластику, для чего полностью заменяли ПРС с добавлением rM-CSF на свежую порцию; частичную замену культуральной среды проводили также на 4-е сутки. Через 7 дней культивирования, перед введением животным, питательную среду, содержащую rM-CSF, полностью удаляли.

### Иммуноцитохимическое окрашивание макрофагов

Для иммуноцитохимического окрашивания выделенных клеток часть из них (1,5–2,0 млн клеток в 500 мкл ПРС) распределяли на поверхности предметных стёкол, помещённых в чашки Петри. Через 1–2 часа добавляли необходимый объём ПРС, содержащей  $\gamma$ M-CSF (50 нг/мл), и культивировали в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора в течение 7 дней. На вторые сутки из культуры убирали клетки, не прикрепившиеся к пластику, для чего полностью заменяли ПРС с добавлением  $\gamma$ M-CSF на свежую порцию; частичную замену культуральной среды проводили также на 4-е сутки культивирования. Через 7 дней стёкла двукратно промывали фосфатно-солевым буферным раствором (1× PBS), фиксировали в ледяном метаноле в течение 2 мин с последующей фиксацией в 2% растворе параформальдегида (Panreac AppliChem, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее стёкла вновь промывали три раза в 1× PBS для удаления остатков параформальдегида и наносили первичные антитела в разведении 1:200 в 1× PBS: к CD68 (ab125212, Abcam, Великобритания), CD43 (#130-133-013, Miltenyi Biotec, Германия) и к маркеру гемопоэтических стволовых клеток — CD34 (#PAB18289, Abnova, Тайвань). Образцы инкубировали с первичными антителами в течение 24 часов при температуре +4 °C. Затем стёкла промывали в 1× PBS для удаления остатков несвязанных антител и проводили реакцию со вторичными антителами, мечеными FITC (ab97050, Abcam, Великобритания) в течение 1,5 часа при +37 °C. После инкубации и удаления излишков вторичных антител стёкла помещали в раствор DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1 мкг/мл в 1× PBS; Servicebio, Китай) для окрашивания ядер, инкубировали 5 мин при +37 °C. Далее стёкла промывали в 1× PBS, заключали в среду Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc., США) и хранили при температуре +4 °C. Съёмку проводили с помощью прямого флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Leica Microsystems, Германия) и программного обеспечения LAS AF (v.3.1.0 build 8587; Leica Microsystems, Германия).

Для каждого препарата делали микрофотографии 10 непересекающихся полей зрения, подсчёт количества флуоресцентно меченных клеток проводили в программе ImageJ (v.1.54p).

### Определение уровней экспрессии генов в макрофагах

Для определения уровней экспрессии про- и противовоспалительных генов в МФ-ККМ и МФ-ПК через 7 дней культивирования удаляли культуральную среду и лизировали клетки в 1 мл реагента для выделения РНК Magzol (Magen Biotechnology, Китай). Образцы МФ-ККМ и МФ-ПК анализировали в трёх биологических повторах. Выделение РНК проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Первую цепь кДНК для определения уровней экспрессии генов *IL-6*, *IL-10*, *IL-1 $\beta$* , *NOS2*, *Arg1* и *Nfkb1* получали из 1 мкг тотальной РНК с помощью набора M-Mlv kit (Evrogen JSC, Россия) согласно рекомендациям производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР) проводили в объёме 25 мкл, содержащем: 400 нг кДНК матрицы, по 400 нМ прямого и обратного праймеров (табл. 1) и 5× qPCRmixHS SYBR (Evrogen JSC, Россия). Все реакции проводили в трёх повторах в детектирующем амплификаторе DTprime ДТ96 (ООО «ДНК-технология», Россия). Специфичность полученного продукта проверяли с помощью анализа кривой плавления ПЦР-продукта в программном обеспечении Real Time PCR (ООО «ДНК-Технология», Россия). По кривой накопления сигнала флуоресценции определяли пороговые циклы (Ct) для всех исследуемых генов. Уровень относительной экспрессии генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ . Нормирование экспрессии каждого гена проводили на ген «домашнего хозяйства»  $\beta$ 2-микроглобулин ( *$\beta$ 2M*).

### Статистические методы

#### Размер выборки

Расчёт размера выборки для *in vivo* эксперимента заранее не проводили. Размер групп был эмпирическим и определялся имеющимися ресурсами. Поскольку

Таблица 1. Последовательности праймеров

Table 1. Primer sequences

Название гена	Прямой праймер (Forward)	Обратный праймер (Reverse)
<i>IL-6</i>	TACATATGTTCTCAGGGAGAT	GGTAGAACCGAACTCCAG
<i>IL-10</i>	GCCCAGAAATCAAGGAGCAT	TGAGTGTCACGTAGGCTCTTA
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	CTGTCTGACCCATGTGAGCT	ACTCCACTTTGGTCTTGACTT
<i>NOS2</i>	CGCTGGTTTGAACCTCTCAG	GGCAAGCCATGTCTGTGAC
<i>Arg1</i>	GGATGAGCATGAGCTCCAAG	GCCAGCTGTTTATTGGCTT
<i>Nfkb1</i>	AGAGCAACCGAAACAGAGAGG	TTTGACAGCCCCACATAGTT
<i><math>\beta</math>2M</i>	CTCGCTCGGTGACCGTGAT	GGACAGATCTGACATCTCGA

исследование носило пилотный характер, размер групп был минимально возможным.

Условия досрочного прекращения исследования не планировались. Исследование проведено в полном объёме.

### Статистический анализ

Определение статистических различий в уровнях экспрессии генов между МФ-ПК и МФ-ККМ проводили в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США) с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ . Для графического представления данные преобразовывали в диаграммы типа «min to max», включающие медиану и верхние/нижние экстремальные значения.

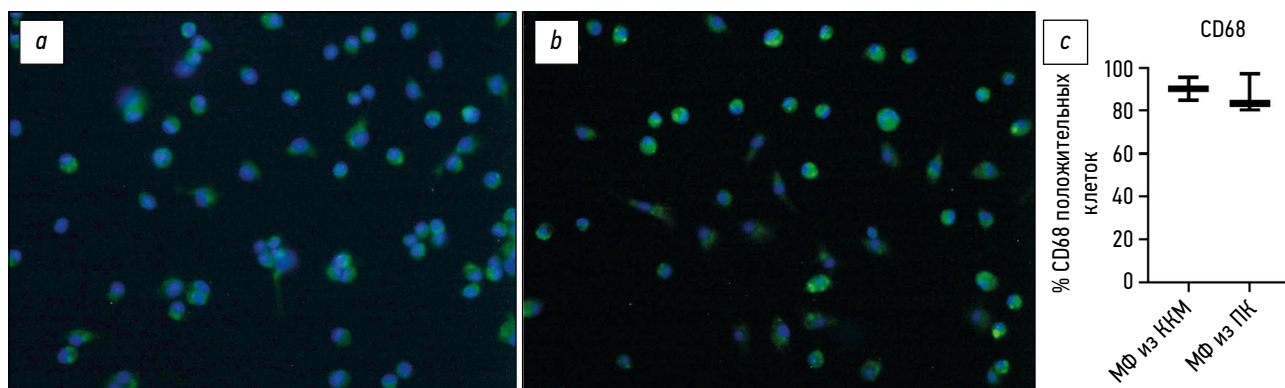
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение зрелости и чистоты получаемой культуры макрофагов оценили с помощью иммуноцитохимического

окрашивания на внутриклеточный пан макрофагальный лизосомально-ассоциированный мембранный белок CD68 и трансмембранный гликопротеин лейкосиалин — CD43 [15]. Окрашивание на оба маркера визуализировалось как в МФ-ККМ, так и в МФ-ПК (рис. 1, 2). При этом положительное окрашивание на маркер гемопоэтических стволовых клеток CD34 не выявлено (рис. 3).

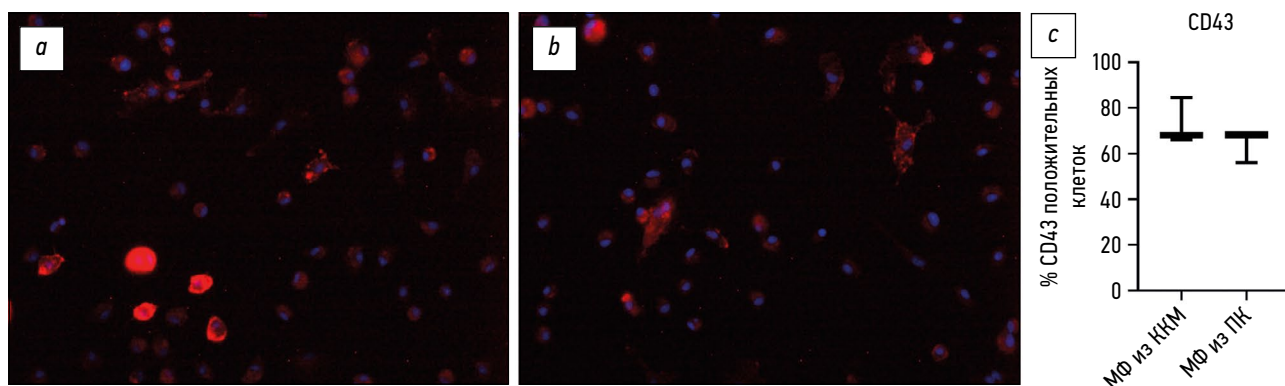
Таким образом, и из красного костного мозга, и из периферической крови были выделены моноциты, которые в присутствии видоспецифического макрофагального колониестимулирующего фактора (rM-CSF) дифференцировались в макрофаги.

На следующем этапе в интактных макрофагах из обоих источников сравнили относительные уровни экспрессии генов, кодирующих регуляторные цитокины (*IL-6* и *IL-10*), провоспалительный цитокин *IL-1 $\beta$*  (*IL-1 $\beta$* ), субъединицу p50 транскрипционного фактора *Nf-k $\beta$*  (*Nfkb1*), аргиназу-1 (*Arg1*) и индуцибельную NO-синтазу (*NOS2*). Уровни экспрессии генов *IL-10* и *IL-6* статистически



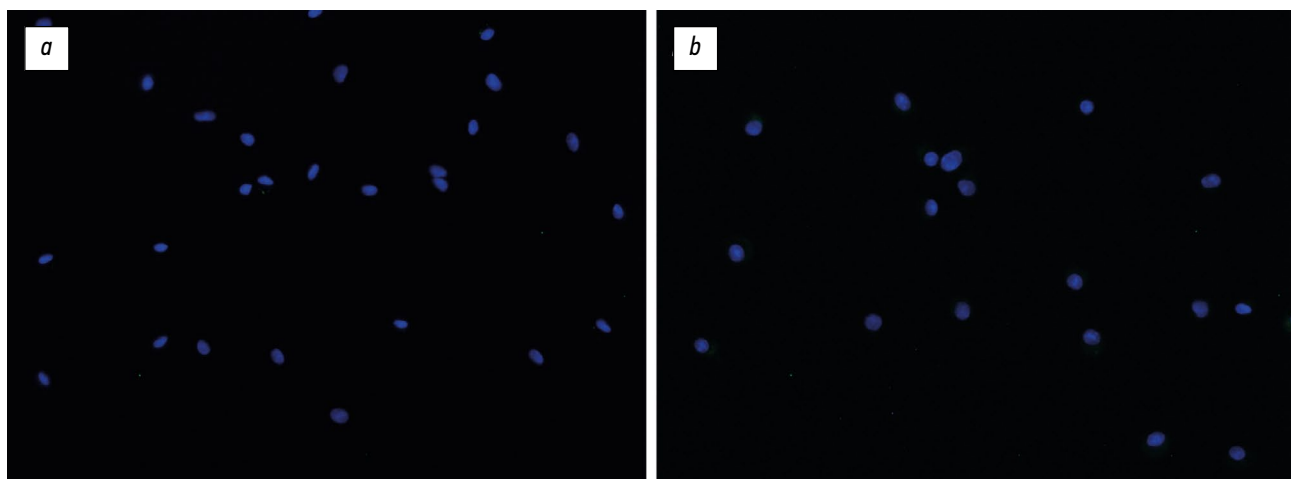
**Рис. 1.** Экспрессия пан макрофагального маркера CD68: *a* — экспрессия CD68 (зелёная флуоресценция) в макрофагах, полученных из красного костного мозга (МФ из ККМ); *b* — экспрессия CD68 в макрофагах, полученных из периферической крови (МФ из ПК); *c* — графическое представление процентного содержания CD68-положительных клеток; синяя флуоресценция — ядра; увеличение  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Expression of the pan-macrophage marker CD68: *a*, CD68 expression (green fluorescence) in macrophages derived from red bone marrow (RBM-derived MPs); *b*, CD68 expression in macrophages derived from peripheral blood (PB-derived MPs); *c*, graphical representation of the percentage of CD68-positive cells; blue fluorescence: nuclei; magnification:  $\times 400$ .



**Рис. 2.** Экспрессия маркера CD43 в макрофагах: *a* — экспрессия CD43 (красная флуоресценция) в макрофагах, культивируемых из красного костного мозга (МФ из ККМ); *b* — экспрессия CD43 в макрофагах, культивируемых из периферической крови (МФ из ПК); *c* — графическое представление процентного содержания CD43-положительных клеток; синяя флуоресценция — ядра; увеличение  $\times 400$ .

**Fig. 2.** Expression of the CD43 marker in macrophages: *a*, CD43 expression (red fluorescence) in macrophages cultured from red bone marrow (RBM-derived MPs); *b*, CD43 expression in macrophages cultured from peripheral blood (PB-derived MPs); *c*, graphical representation of the percentage of CD43-positive cells; blue fluorescence: nuclei; magnification:  $\times 400$ .



**Рис. 3.** Отсутствие экспрессии маркера CD34 в макрофагах: *a* — полученных из красного костного мозга; *b* — полученных из периферической крови; синяя флуоресценция — ядра; увеличение  $\times 400$ .

**Fig. 3.** Absence of CD34 marker expression in macrophages: *a*, derived from red bone marrow; *b*, derived from peripheral blood; blue fluorescence: nuclei; magnification:  $\times 400$ .

значимо выше в МФ-ККМ, чем в МФ-ПК ( $p = 0,027$  и  $p = 0,029$  соответственно); экспрессия *Arg1* и *NOS2*, напротив, была выше в МФ-ПК ( $p = 0,029$  для обоих генов; рис. 4, 5). Не выявлено статистически значимых различий в уровне экспрессии генов *IL-1 $\beta$*  и *Nfkb1*.

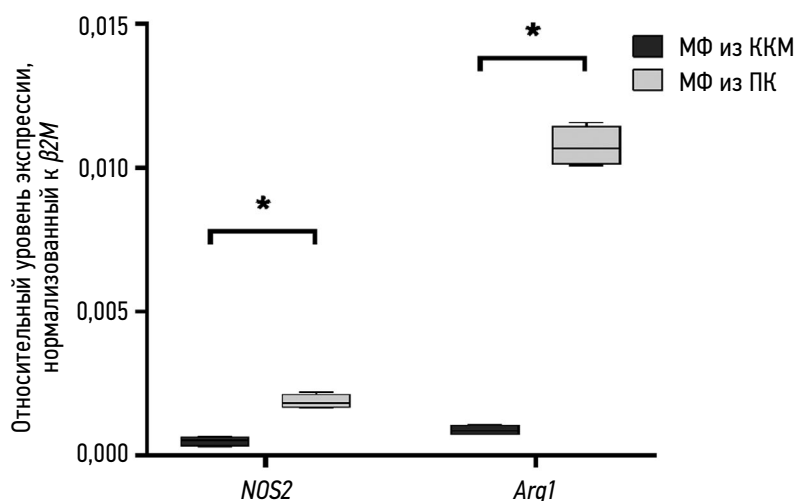
Одной из ключевых функций МФ является участие в процессах регенерации, в том числе в заживлении ран кожи. Оценка эффектов МФ, полученных из двух источников, на заживление ран показала, что на следующий день после введения МФ-ПК по краям раны визуализировался выпот желтоватого цвета, а у крыс после инъекции МФ-ККМ рана кровоточила (данные не представлены). На 7-й день после воздействия края ран у крыс контрольной группы спокойные, рана не гиперемирована; у животных, которым вводили МФ-ККМ, отмечалась

повышенная кровоточивость. На 14-й день — у крыс контрольной группы струп не визуализировался; у крыс, которым вводили МФ-ПК и МФ-ККМ струп начал отпадать, однако у животных после введения МФ-ККМ отмечена повышенная гиперемия (рис. 6). Таким образом, введение макрофагов существенно не изменило темпы заживления ран кожи (рис. 7). Тяжёлых побочных эффектов после введения МФ не выявлено, однако при использовании МФ-ККМ отмечена высокая кровоточивость ран.

## ОБСУЖДЕНИЕ

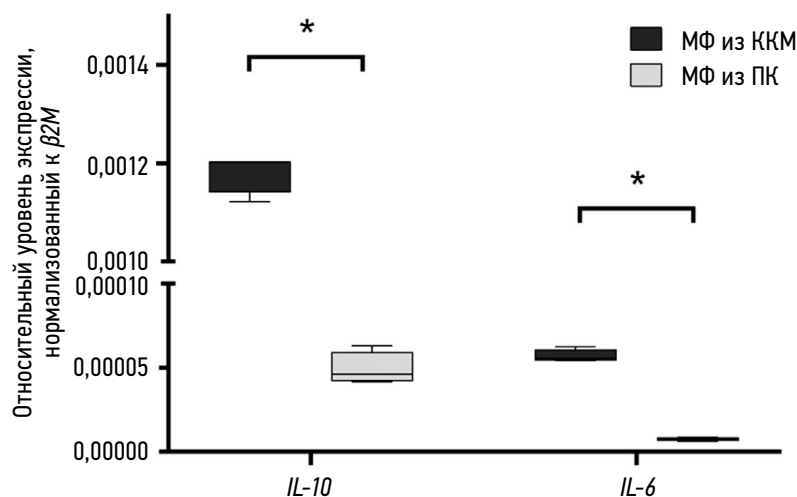
### Резюме результатов исследования

Впервые проведено сравнение уровней экспрессии генов, кодирующих цитокины, и участия макрофагов,



**Рис. 4.** Относительная экспрессии генов, кодирующих индуцибельную синтазу оксида азота (*NOS2*) и аргиназу-1 (*Arg1*) в макрофагах: МФ из ККМ — макрофаги, полученные из красного костного мозга; МФ из ПК — макрофаги, полученные из периферической крови; Критерий Манна–Уитни,  $* p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Relative expression of genes encoding inducible nitric oxide synthase (*NOS2*) and arginase-1 (*Arg1*) in macrophages: RBM-derived MPs, macrophages derived from red bone marrow; PB-derived MPs, macrophages derived from peripheral blood; Mann–Whitney *U* test,  $* p < 0.05$ .



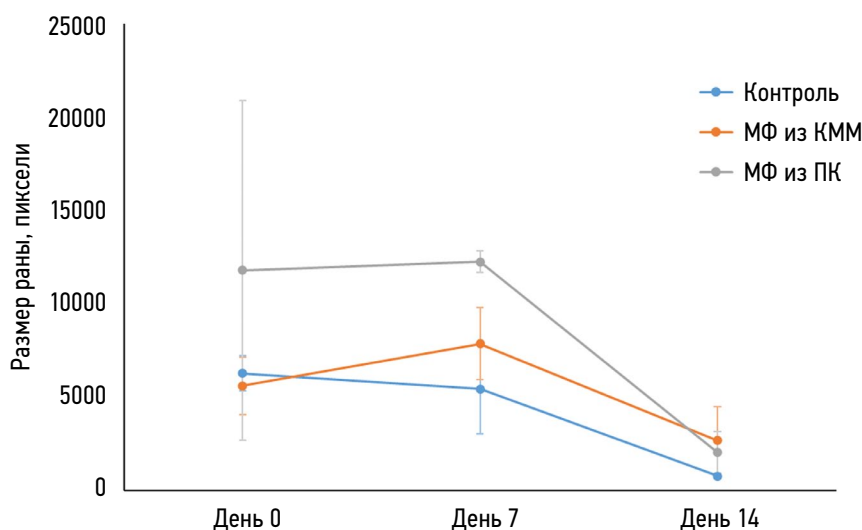
**Рис. 5.** Относительная экспрессия генов, кодирующих интерлейкин-10 (*IL-10*) и интерлейкин-6 (*IL-6*) в макрофагах: МФ из ККМ — макрофаги, полученные из красного костного мозга; МФ из ПК — макрофаги, полученные из периферической крови; Критерий Манна–Уитни, \*  $p < 0,05$ .  
**Fig. 5.** Relative expression of genes encoding interleukin-10 (*IL-10*) and interleukin-6 (*IL-6*) in macrophages: RBM-derived MPs, macrophages derived from red bone marrow; PB-derived MPs, macrophages derived from peripheral blood; Mann–Whitney  $U$  test, \*  $p < 0.05$ .

полученных из двух источников — костного мозга и периферической крови — в заживлении ран кожи. Определение фенотипа МФ, культивированных в присутствии видоспецифического ростового фактора, показало отсутствие различий в экспрессии панмакрофагального маркера CD68 и панлейкоцитарного маркера CD43.

При определении уровней экспрессии генов, ассоциированных с иммунным ответом, а именно генов регуляторных цитокинов *IL-6* и *IL-10*, выявлены значимые различия между МФ-ККМ и МФ-ПК. Макрофаги, полученные из ККМ, демонстрировали высокий уровень экспрессии генов *IL-6* и *IL-10*, что, вероятно, указывает на их



**Рис. 6.** Репрезентативные фотографии ран у крысы контрольной группы и у животных, которым вводили макрофаги, культивированные из периферической крови (МФ из ПК) и из красного костного мозга (МФ из ККМ), на 0, 7 и 14-е сутки после моделирования эксцизионной раны.  
**Fig. 6.** Representative images of wounds in control rats and in animals treated with macrophages cultured from peripheral blood (PB-derived MPs) and red bone marrow (RBM-derived MPs) on days 0, 7, and 14 after excisional wound modeling.



**Рис. 7.** Изменение размера раны с течением времени: контроль — крысы, у которых рана оставалась интактной; МФ из КММ — крысы, которым вводили макрофаги, полученные из моноцитарных предшественников красного костного мозга; МФ из ПК — крысы, которым вводили макрофаги, полученные из моноцитов периферической крови.

**Fig. 7.** Changes in wound size over time: Control, rats with untreated wounds; RBM-derived MPs, rats treated with macrophages derived from bone marrow monocyte precursors; PB-derived MPs, rats treated with macrophages derived from peripheral blood monocytes.

повышенный потенциал к быстрой активации в ответ на сигналы микроокружения. В то же время, в МФ-ПК повышена экспрессия генов, кодирующих ферменты, участвующие в превращениях L-аргинина (*Arg1* и *NOS2*) и отражающие способность макрофагов влиять на регенеративные процессы в тканях.

На экспериментальной модели послышной эксцизионной раны кожи спины показано, что несмотря на отсутствие различий в темпах регенерации, при введении в края раны МФ-КММ и МФ-ПК наблюдаются особенности тканевых реакций. Применение МФ-КММ сопровождалось повышенной кровоточивостью раны и её гиперемией. Однако отсутствие тяжёлых осложнений свидетельствует о приемлемой безопасности обоих типов клеток при их применении *in vivo*.

Полученные результаты указывают на гетерогенность макрофагов, культивированных из КММ и ПК, а также обосновывают преимущества использования МФ-ПК при разработке клеточной терапии заживления ран кожи.

### Интерпретация результатов исследования

Макрофаги представляют большой интерес для клеточной терапии различных заболеваний. Несмотря на то, что изучением этих клеток занимаются уже более 100 лет, до сих пор не существует стандартного протокола их культивирования. В качестве фактора дифференцировки моноцитов в макрофаги используют M-CSF человека или кондиционированную среду клеток линии L929-СМ, обогащённую M-CSF [16, 17]. Различия в условиях культивирования приводят не только к вариативности результатов, но и обуславливают необходимость подтверждения экспрессии ключевых маркеров

макрофагов в полученных популяциях клеток. В данной работе дифференцировка моноцитов в макрофаги проведена в присутствии рекомбинантного видоспецифического макрофагального колониестимулирующего фактора rM-CSF. Макросиалин (CD68) и лейкосиалин/сиалофорин (CD43) были использованы для идентификации полученных клеток [18]. CD68 — высокогликозилированный гликопротеин, конститутивно экспрессирующийся в макрофагах [18]. Показана его связь с лизосомальными белками, что указывает на участие в процессах фагоцитоза [18]. Несмотря на то, что роль CD68 в функционировании макрофагов остаётся не до конца изученной, в исследовательской и клинической практике этот маркер используют для обнаружения и количественной оценки макрофагов в различных тканях, включая очаги воспаления и опухоли [19]. При опухолях, например при раке молочной железы, инфильтрация CD68<sup>+</sup> клетками коррелирует с клиническими исходами [19].

Лейкосиалин обнаруживается на поверхности Т-лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. Основная функция лейкосиалина в функционировании моноцитов и макрофагов — это участие в адгезии и миграции клеток, а также в их дифференцировке и апоптозе [20]. По уровню экспрессии CD43 в популяции моноцитов крысы, как и у человека, выделяют два подтипа клеток — CD43<sup>high</sup> (неклассические моноциты) и CD43<sup>low</sup> (классические). Первый подтип является мажорным и составляет 90% всех моноцитов; клетки второго подтипа характеризуются высоким уровнем экспрессии CD200R — рецептора к мембранному белку CD200, выступающему кофактором пролиферации Т-лимфоцитов. CD200R участвует в регуляции продукции провоспалительных факторов TNFα и NO [21].

Отмечено, что макрофаги в меньшей степени, чем моноциты экспрессируют CD43, однако CD43 на их поверхности представлен высокогликозилированной формой [22].

Таким образом, экспрессия CD68 и CD43 в макрофагах, культивированных из периферической крови и костномозговых предшественников, говорит о том, что при воздействии видоспецифического фактора роста, а именно макрофагального колониестимулирующего фактора крыс, моноциты из обоих источников дифференцируются в макрофаги.

Две популяции макрофагов оценили по относительной экспрессии (относительно гена домашнего хозяйства бета-2-микроглобулина) генов, кодирующих провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$ , транскрипционный фактор Nf- $\kappa$ b, регуляторные цитокины IL-6 и IL-10 и ферменты, участвующие в обмене L-аргинина — аргиназу-1 и индуцибельную синтазу оксида азота. IL-10 — это плейотропный цитокин, секретируемый практически всеми типами иммунных клеток, включая T- и B-лимфоциты, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы и NK-клетки. IL-10 взаимодействует со своим специфическим рецептором на поверхности макрофагов и тем самым инициирует активацию сигнальных путей STAT3 и PI3K/Akt/mTORC1. Этот механизм обуславливает противовоспалительный эффект IL-10, проявляющийся в модификации локального цитокинового окружения, уменьшении представления антигенов, а также в снижении продукции оксида азота и активных форм кислорода. Кроме того, IL-10 способствует изменению клеточного метаболизма и направляет его преимущественно в сторону окислительного фосфорилирования [23]. Однако в условиях хронического воспаления высокий уровень IL-10 приводит к персистенции патогена и повреждению тканей [24]. Первоначально IL-6 был описан как провоспалительный цитокин, однако более поздние исследования показали, что он участвует в формировании противовоспалительного фенотипа макрофагов. IL-6 способствует поляризации макрофагов в направлении, характеризующемся повышенной экспрессией таких маркеров, как аргиназа-1, хитиназоподобный белок Ym1 (Chil3) и маннозный рецептор CD206 [25]. Реализация этого эффекта часто требует костимуляции интерлейкинами IL-4 и IL-13 [26]. Кроме того, IL-6 может подавлять продукцию оксида азота, индуцированную липополисахаридом внешней стенки грамотрицательных бактерий, и ингибировать продукцию цитокинов активированными CD4<sup>+</sup> T-клетками, то есть выполнять иммунорегуляторные функции [26]. Для МФ-ККМ показан конститутивно высокий уровень экспрессии гена *IL-6*, необходимого для кроветворения, что согласуется с нашими результатами [27]. Таким образом, учитывая роль IL-6 и IL-10 в развитии и разрешении воспалительных реакций, высокий уровень

экспрессии этих генов в МФ-ККМ может отражать исходно повышенную функциональную активность клеток, способствующую более быстрому реагированию на внешние воздействия.

В результате проведённого исследования установлено, что экспрессия генов, вовлечённых в превращение L-аргинина — *NOS2* и *Arg1*, — значимо повышена в МФ-ПК. Условно незаменимая аминокислота L-аргинин играет важную роль в заживлении ран кожи как напрямую, так и опосредованно через изменение фенотипа макрофагов. В первом случае индуцируемая синтаза оксида азота (*NOS2*) катализирует окисление L-аргинина до оксида азота и цитруллина. NO усиливает антимикробную активность, способствует вазодилатации и улучшает приток крови к ране, облегчая тем самым доставку кислорода и питательных веществ, необходимых для восстановления тканей. Аргиназа участвует в гидролизе L-аргинина — отщепляет от него мочевины с образованием L-орнитина, из которого впоследствии образуется L-пролин. Пролин является важной аминокислотой для синтеза коллагена, необходимого для поддержания структуры и функций соединительной ткани (кожи, костей и хрящей) и играющего ключевую роль в формировании новой ткани [28, 29].

В контексте настоящего исследования наибольший интерес представляет опосредованное через поляризацию макрофагов участие условно незаменимой аминокислоты L-аргинина в заживлении ран кожи. Известно, что для провоспалительного фенотипа МФ в очаге воспаления характерен повышенный уровень экспрессии *NOS2*, тогда как для противовоспалительного фенотипа МФ в пролиферативной и регенераторной фазах заживления ран кожи — аргиназы-1 [30]. Таким образом, баланс между активностью *NOS2* и *Arg1* в процессах превращения аминокислоты L-аргинина определяет эффективность регенерации тканей и зависит от поляризации МФ.

У животных с послышной эксцизионной раной кожи после введения макрофагов в зону повреждения не выявлено увеличения темпов заживления, однако отмечены различия в локальной реакции. У крыс, которым в края раны вводили МФ-ККМ, наблюдали повышенную кровоточивость и гиперемию. Возможно, что такая тканевая реакция связана с более высокой исходной функциональной активностью МФ-ККМ, поскольку нами показан повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих регуляторные цитокины IL-10 и IL-6 в этих клетках. Можно предположить, что при попадании в очаг воспаления МФ поляризуются в провоспалительные клетки и усиливают воспалительную реакцию, что приводит к гиперемии и кровоточивости. С другой стороны, при введении в края раны МФ-ПК с высоким базовым уровнем экспрессии гена аргиназы-1 происходит усиленная секреция пролина, необходимого для регенерации. Отсутствие тяжёлых

побочных эффектов от введения макрофагов в обеих опытных группах свидетельствует о хорошей переносимости клеточной терапии. Вместе с тем выявленные визуальные различия указывают на необходимость дальнейшего изучения того, как источник выделения макрофагов влияет на их участие в регенеративных процессах [31].

В проведённом исследовании обнаружены значимые различия между МФ-КММ и МФ-ПК по уровням экспрессии генов, участвующих в иммунных реакциях. При этом, несмотря на сходный фенотип (экспрессию CD68 и CD43), МФ-КММ характеризуются более высокой экспрессией генов регуляторных цитокинов IL-6 и IL-10, что указывает на повышенный потенциал к активации. В то же время для МФ-ПК характерна более значительная экспрессия генов, связанных с превращениями L-аргинина (*Arg1*, *NOS2*), что отражает их потенциальную роль в репаративных процессах. Различия в уровнях экспрессии генов между двумя опытными группами согласуются с результатами, полученными *in vivo*. Наблюдавшиеся гиперемия и кровоточивость раны после введения МФ-КММ, вероятно, связаны с провоспалительной активацией этих клеток в раневом микроокружении. В то же время МФ-ПК предположительно способствуют репаративным процессам за счёт продукции пролина и регуляции метаболизма L-аргинина.

Полученные данные свидетельствуют о значительном потенциале макрофагов, культивируемых из периферической крови, для разработки методов лечения ран кожи. МФ-ПК характеризуются потенциальной способностью улучшать регенерацию тканей и более низкой провоспалительной активностью. Однако для экстраполяции полученных результатов на человека необходимы дальнейшие исследования, которые будут включать гистологическую детализацию процессов восстановления целостности кожных покровов при введении макрофагов, а также подбор оптимального количества вводимых клеток.

### Ограничения исследования

Данное исследование имеет ряд ограничений. В связи с ограниченностью ресурсов в исследование не включена группа животных, которым в края раны вводили бы только кондиционированную среду без клеток. Весомым недостатком *in vivo* эксперимента является проведение только визуального осмотра животных. Для подтверждения полученных результатов необходимы дополнительные исследования с увеличением количества групп животных и применением дополнительных методов оценки процесса заживления ран, таких как гистологическое исследование.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование позволило охарактеризовать молекулярно-биологические особенности

макрофагов, полученных из двух источников — красного костного мозга и периферической крови, а также оценить их терапевтический потенциал в модели послышной эксцизионной раны кожи спины. Ключевым результатом исследования стало выявление различий в экспрессии генов, регулирующих иммунный ответ и метаболические процессы. МФ-КММ характеризуются повышенной экспрессией генов регуляторных цитокинов (*IL-6* и *IL-10*), что свидетельствует о более высоком потенциале этих клеток к быстрой активации в ответ на изменения микроокружения. В то же время МФ-ПК проявляли более высокую активность генов, кодирующих ферменты, участвующие в преобразованиях L-аргинина (*Arg1* и *NOS2*), что отражает способность этих клеток влиять на процессы регенерации тканей. Полученные данные согласуются с представлениями о функциональной пластичности макрофагов и зависимости их активности от источника происхождения. Экспериментальная апробация МФ в модели послышной эксцизионной раны кожи спины не выявила значимого увеличения темпов заживления, однако продемонстрировала различия в локальной реакции тканей. Введение МФ-КММ сопровождалось кровоточивостью раны и гиперемией прилежащих тканей, что, вероятно, связано с провоспалительным потенциалом этих клеток. Вместе с тем отсутствие тяжёлых осложнений свидетельствует о безопасности применения обоих типов МФ. Таким образом, полученные результаты подчёркивают важность выбора источника получения макрофагов для клеточной терапии и подтверждают потенциальную возможность их использования при лечении нарушений заживления ран у человека. Необходимы дополнительные исследования, направленные на оптимизацию клеточного продукта и включающие апробацию применения обоих типов МФ на разных фазах раневого процесса (острое воспаление или репарация), использование клеток, модифицированных *in vitro*, а также определение оптимальной дозы введения.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** В.В. Киселева — определение концепции, проведение исследования, написание черновика рукописи; П.А. Вишнякова — определение концепции, руководство исследованием; И.С. Цветков — проведение исследования; А.М. Косырева — определение концепции, руководство исследованием, пересмотр и редактирование рукописи; А.В. Ельчанинов и Т.Х. Фатхудинов — руководство исследованием, обеспечение исследования, администрирование. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Этическая экспертиза.** Исследование проведено в соответствии с решением Этического комитета НИИ морфологии человека им. А.И. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени

академика Б.В. Петровского», протокол № 21 от 29 марта 2019 г. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с рекомендациями ARRIVE и Директивой ЕС 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях [13]. Были приложены все усилия для минимизации страданий и дистресса животных.

**Источники финансирования.** Работа поддержана Российским научным фондом (номер гранта 24-25-00203).

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

**Оригинальность.** При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

**Доступ к данным.** Все данные, полученные в настоящем исследовании, представлены в статье.

**Генеративный искусственный интеллект.** При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

**Рассмотрение и рецензирование.** Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Author contributions:** V.V. Kiseleva: conceptualization, investigation, writing—original draft; P.A. Vishnyakova: conceptualization, supervision; I.S. Tsvetkov: investigation; A.M. Kosyreva: conceptualization, supervision,

writing—review & editing; A.V. Elchaninov: supervision, resources, project administration; T.Kh. Fatkhudinov: supervision, resources, project administration. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Ethics approval:** The study was conducted in accordance with the decision of the Ethics Committee of the Research Institute of Human Morphology named after A.I. Avtsyn, Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Minutes No. 21 dated March 29, 2019. All animal procedures were performed in accordance with the ARRIVE guidelines and Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes [13]. All efforts were made to minimize animal suffering and distress.

**Funding sources:** The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-25-00203).

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

**Statement of originality:** No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

**Data availability statement:** All data obtained in this study are available in the article.

**Generative AI:** No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

**Provenance and peer-review:** This article was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer-review process involved two external reviewers, a member of the Editorial Board, and the in-house science editor.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Kosyreva A, Dzhililova D, Lokhonina A, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome. *Front Immunol.* 2021;12:682871. doi: 10.3389/fimmu.2021.682871 EDN: TZAKHF
- Vishnyakova PA, Elchaninov AV, Kiseleva VV, et al. The role of placental macrophages in physiological pregnancy and preeclampsia. *Akusherstvo i Ginekologiya.* 2022;(4):5–12. doi: 10.18565/aig.2022.4.5-12 EDN: JFYDTU
- Hou P, Fang J, Liu Z, et al. Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis. *Cell Death Dis.* 2023;14(10):691. doi: 10.1038/s41419-023-06206-z EDN: LRCLHA
- van der Veen TA, de Groot LES, Melgert BN. The different faces of the macrophage in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2020;26(1):62–68. doi: 10.1097/MCP.0000000000000647 EDN: CLLYMR
- Elchaninov AV, Fatkhudinov TKh. *Macrophages.* Moscow: GEOTAR-Media: 2023. doi: 10.33029/9704-7780-9-EAM-2023-1-208 ISBN: 978-5-9704-7780-9
- Krzyszczak P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol.* 2018;9:419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419
- Kananykhina EY, Shmakova TV, Bolshakova GB, et al. Expression of metalloproteinases and type I and III collagens during healing of excisional skin wound on the abdomen and back in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168(6):812–816. doi: 10.1007/s10517-020-04808-7 EDN: VDISPL
- Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol.* 2017;38(6):395–406. doi: 10.1016/j.it.2017.03.001 EDN: YEFASG
- Kurkin DV, Abrosimova EE, Bakulin DA, et al. Activity modulation of various nitric oxide synthases as an approach to endothelial dysfunction therapy. *Pharmacy & Pharmacology.* 2022;10(2):130–153. doi: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153 EDN: EMPVWW
- Rath M, Müller I, Kropf P, et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol.* 2014;5:532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532 EDN: UOZVWH
- Na YR, Kim SW, Seok SH. A new era of macrophage-based cell therapy. *Exp Mol Med.* 2023;55(9):1945–1954. doi: 10.1038/s12276-023-01068-z EDN: WAGONK
- Smith HL, Foxall RB, Duriez PJ, et al. Comparison of human macrophages derived from peripheral blood and bone marrow. *J Immunol.* 2025;214(4):714–725. doi: 10.1093/jimmun/vkae032 EDN: JFVGGB
- Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410 EDN: QUQBWW
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089 Halimani N, Nesterchuk M, Andreichenko IN, et al. Phenotypic alteration of BMDM in vitro using small interfering RNA. *Cells.* 2022;11(16):2498. doi: 10.3390/cells11162498 EDN: WCZCTY
- Guo XY, Wang SN, Wu Y, et al. Transcriptome profile of rat genes in bone marrow-derived macrophages at different activation statuses by RNA-

- sequencing. *Genomics*. 2019;111(4):986–996. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.06.006 EDN: KANFDI
16. Pridans C, Irvine KM, Davis GM, et al. Transcriptomic analysis of rat macrophages. *Front Immunol*. 2021;11:594594. doi: 10.3389/fimmu.2020.594594 EDN: DEDMCX
17. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017;97(1):4–13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116 EDN: YUVZSL
18. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;23:12:306. doi: 10.1186/1471-2407-12-306 EDN: TFKSML
19. Ahuja V, Miller SE, Howell DN. Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43. *Cell Immunol*. 1995;163(1):59–69. doi: 10.1006/cimm.1995.1099
20. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation. *PLoS One*. 2016;11(1):e0142520. doi: 10.1371/journal.pone.0142520
21. Chung J, Vallurupalli M, Noel S, et al. Sialylated CD43 is a glyco-immune checkpoint for macrophage phagocytosis. Preprint. *bioRxiv*. 2025:2025.05.05.652090. doi: 10.1101/2025.05.05.652090
22. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1):e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418 EDN: EMGKMP
23. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections. *J Immunol Res*. 2017;2017:6104054. doi: 10.1155/2017/6104054. EDN: YEEOTZ
24. Kang Q, Li L, Pang Y, et al. An update on Ym1 and its immunoregulatory role in diseases. *Front Immunol*. 2022;13:891220. doi: 10.3389/fimmu.2022.891220 EDN: SSZIH Y
25. Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, et al. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One*. 2014;15:9(4):e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188
26. Cluitmans FH, Esendam BH, Landegent JE, et al. Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the bone marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood*. 1995;85(8):2038–2044.
27. Alexander JW, Supp DM. Role of arginine and omega-3 fatty acids in wound healing and infection. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(11):682–690. doi: 10.1089/wound.2013.0469
28. Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, et al. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing. *Cells*. 2022;11(19):2953. doi: 10.3390/cells11192953 EDN: LPMXWJ
29. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008
30. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450–462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015 EDN: WUEPIZ

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

### \*Киселева Виктория Викторовна;

адрес: Россия, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4;  
ORCID: 0000-0002-3001-4820;  
eLibrary SPIN: 2698-1448;  
e-mail: victoria.kurnosova.1991@gmail.com

### Вишнякова Полина Александровна, канд. биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-8650-8240;  
eLibrary SPIN: 3406-3866;  
e-mail: vpa2002@mail.ru

### Цветков Иван Сергеевич, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0003-0946-1105;  
eLibrary SPIN: 6842-0264;  
e-mail: davedm66@gmail.com

### Ельчанинов Андрей Владимирович, д-р биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0002-2392-4439;  
eLibrary SPIN: 5160-9029;  
e-mail: elchandrey@yandex.ru

### Косырева Анна Михайловна, д-р биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0002-6182-1799;  
eLibrary SPIN: 5421-5520;  
e-mail: kosyreva.a@list.ru

### Фатхудинов Тимур Хайсамудинович, д-р мед. наук, профессор;

ORCID: 0000-0002-6498-5764;  
eLibrary SPIN: 7919-8430;  
e-mail: tfat@yandex.ru

## AUTHORS' INFO

### \*Viktorii V. Kiseleva;

address: 4 Akademika Oparina st, Moscow, Russia, 117997;  
ORCID: 0000-0002-3001-4820;  
eLibrary SPIN: 2698-1448;  
e-mail: victoria.kurnosova.1991@gmail.com

### Polina A. Vishnyakova, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0001-8650-8240;  
eLibrary SPIN: 3406-3866;  
e-mail: vpa2002@mail.ru

### Ivan S. Tsvetkov, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0003-0946-1105;  
eLibrary SPIN: 6842-0264;  
e-mail: davedm66@gmail.com

### Andrey V. Elchaninov, Dr. Sci. (Biology), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0002-2392-4439;  
eLibrary SPIN: 5160-9029;  
e-mail: elchandrey@yandex.ru

### Anna M. Kosyreva, Dr. Sci. (Biology), Assistant Professor;

ORCID: 0000-0002-6182-1799;  
eLibrary SPIN: 5421-5520;  
e-mail: kosyreva.a@list.ru

### Timur Kh. Fatkhudinov, Dr. Sci. (Medicine), Professor;

ORCID: 0000-0002-6498-5764;  
eLibrary SPIN: 7919-8430;  
e-mail: tfat@yandex.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author