

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НИШЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНОЙ СТЕВОЛОЙ КЛЕТКИ

DOI: 10.17691/stm2025.17.2.04

УДК 576.3:612.616.3

Поступила 25.06.2024 г.

© **А.О. Монакова**, аспирант факультета фундаментальной медицины; лаборант-исследователь Центра регенеративной медицины¹;
Н.А. Басалова, к.б.н., младший научный сотрудник Центра регенеративной медицины¹;
В.Ю. Балабаньян, д.фарм.н., ведущий научный сотрудник Центра регенеративной медицины¹;
К.Л. Крышень, к.б.н., руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии²;
А.А. Матичин, руководитель отдела специфической токсикологии и фармакодинамики²;
Г.Д. Сагарадзе, к.б.н., младший научный сотрудник Центра регенеративной медицины¹;
В.С. Попов, к.б.н., зав. межфакультетской научно-исследовательской лабораторией трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины; ведущий научный сотрудник Центра регенеративной медицины¹;
А.Ю. Ефименко, д.м.н., зав. лабораторией репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины¹

¹Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ломоносовский пр., 27, кор. 10, Москва, 119234;

²Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», ул. Заводская, 3, кор. 245, Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., 188663

Постнатальные стволовые клетки в окружении ниши на протяжении жизни поддерживают обновление и регенерацию тканей и органов. Дисфункция компонентов ниши может привести к развитию трудноизлечимых заболеваний. Ранее мы показали, что инъекция секретом мезенхимных стромальных клеток (МСК) под белочную оболочку яичка грызунов способствует восстановлению ниши сперматогонимальных стволовых клеток, однако механизмы этого процесса до конца не выяснены.

Цель исследования — изучение влияния секретом МСК на резидентные макрофаги при повреждении ниши сперматогонимальных стволовых клеток и на перитонеальные макрофаги у интактных животных.

Материалы и методы. Для изучения влияния секретом МСК на макрофаги у мышей моделировали токсическое повреждение сперматогенеза путем внутрибрюшинных инъекций доксорубина в дозе 1 мг/кг с периодичностью раз в два дня до достижения суммарной дозы 10 мг/кг. В качестве второй модели использовали модель крипторхизма у крыс. Секретом МСК вводили под белочную оболочку яичка. Были сформированы группы: «интактные», «повреждение», «секретом МСК». У животных выделяли семенники и оценивали количество макрофагов с помощью иммуногистохимического анализа. Для изучения фагоцитарной активности макрофагов проводили внутримышечную инъекцию секретом МСК в бедро мыши, а затем выделяли перитонеальные макрофаги и анализировали их способность поглощать латексные частицы FITC.

Результаты. В модели крипторхизма мы показали значимое увеличение числа CD163⁺ M2-макрофагов в интерстициальном пространстве семенников. Инъекция секретом МСК под белочную оболочку яичка приводила к снижению количества CD163⁺ M2-макрофагов. В модели токсического повреждения сперматогенеза доксорубином количество CD163⁺ M2-макрофагов в интерстициальном пространстве увеличивалось, однако не изменилось в группе с инъекцией секретом МСК. Число M2-макрофагов в данной модели, положительных по другому классическому маркеру CD206, также возрастало, при этом введение секретом МСК не уменьшало их количество как на ранних, так и на поздних сроках повреждения. Исследование влияния секре-

Для контактов: Ефименко Анастасия Юрьевна, e-mail: efimenkoay@my.msu.ru

тома МСК на перитониальные макрофаги показало, что его однократное внутримышечное введение здоровым мышам в дозах меньшей и большей, чем терапевтическая, не снижает, а, наоборот, увеличивает фагоцитарную активность макрофагов.

Заключение. Полученные результаты указывают на влияние этиологии и патогенеза повреждения на вовлеченность М2-макрофагов в реализацию эффектов секретомы МСК, а также на отсутствие системной иммунотоксичности секретомы МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; секретомы; макрофаги; сперматогонияльные стволовые клетки; ниша стволовых клеток; сперматогенез; иммунотоксичность.

Как цитировать: Monakova A.O., Basalova N.A., Balabanyan V.Yu., Kryshen K.L., Matichin A.A., Sagaradze G.D., Popov V.S., Efimenko A.Yu. The role of macrophages in implementing the effects of secretome of mesenchymal stromal cells in the spermatogonial stem cell niche. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2025; 17(2): 37, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.2.04>

English

The Role of Macrophages in Implementing the Effects of Secretome of Mesenchymal Stromal Cells in the Spermatogonial Stem Cell Niche

A.O. Monakova, PhD Student, Faculty of Medicine; Laboratory Assistant, Center for Regenerative Medicine¹;

N.A. Basalova, PhD, Junior Researcher, Center for Regenerative Medicine¹;

V.Yu. Balabanyan, DSc, Leading Researcher, Center for Regenerative Medicine¹;

K.L. Kryshen, PhD, Head of Specific Toxicology and Microbiology Department²;

A.A. Matichin, Head of Specific Toxicology and Pharmacodynamics Department²;

G.D. Sagaradze, PhD, Junior Researcher, Center for Regenerative Medicine¹;

V.S. Popov, PhD, Head of Interfaculty Scientific Research Laboratory of Translation Medicine, Faculty of Medicine; Leading Researcher, Center for Regenerative Medicine¹;

A.Yu. Efimenko, MD, DSc, Head of Laboratory of Tissue Repair and Regeneration, Center for Regenerative Medicine; Associate Professor, Biochemistry and Regenerative Biomedicine Department, Faculty of Medicine¹

¹Medical Scientific and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, 27/10 Lomonosovsky Prospekt, Moscow, 119234, Russia;

²Research and Manufacturing Company "HOME OF PHARMACY", 3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, 188663, Russia

Postnatal stem cells surrounded by a niche support the renewal and regeneration of tissues and organs throughout life. The dysfunction of niche components can lead to the development of diseases, which are hard to cure. We previously showed that the subcutaneous injection of mesenchymal stromal cell (MSC) secretome induced the spermatogonial stem cell niche restoration, although the mechanisms of the process are not fully revealed.

The study aimed at analyzing the effect of the MSC secretome on resident macrophages in animal models of male infertility and on peritoneal macrophages of intact animals.

Materials and Methods. To study the effect of the MSC secretome on resident macrophages, doxorubicin-induced damage of murine spermatogenesis was modeled by intraperitoneal injections of 1 mg/kg of doxorubicin once in two days to reach a cumulative dose of 10 mg/kg. The second animal model of spermatogenesis injury was the abdominal cryptorchidism in rats. The MSC secretome was injected under the tunica albuginea. The animals were divided into the following groups: "intact", "damage", "MSC secretome". After isolating the testes, the number of macrophages was estimated using the immunohistochemical analysis. To investigate the phagocytic activity of macrophages mice were intramuscularly injected into the thigh with the MSC secretome with the following isolation of peritoneal macrophages. The ability of peritoneal macrophages to absorb FITC latex particles was analyzed.

Results. In cryptorchidism model the number of CD163⁺ M2 macrophages in the interstitium of testes increased significantly. The MSC secretome injection under the tunica albuginea of the testicle led to decreasing the number of CD163⁺ M2 macrophages. In the model of the toxic damage of spermatogenesis with doxorubicin the number of CD163⁺ M2 macrophages in the interstitium increased, however, there were no effects in the group with the MSC secretome injection. The number of M2 macrophages in this model, positive for another classical marker CD206, also increased, but the administration of MSC secretome reduced their number neither during the early nor in the late periods after damage. The study of MSC secretome effects on peritoneal macrophages demonstrated that a single intramuscular injection of MSC secretome in doses lower and higher than the therapeutic dose didn't reduce, but conversely increased the phagocytic activity of macrophages.

Conclusion. Our findings indicate the impact of the damage etiology and pathogenesis on the involvement of M2 macrophages in the implementation of the MSC secretome effects and the absence of its systemic immunotoxicity.

Key words: mesenchymal stromal cells; secretome; macrophages; spermatogonial stem cells; stem cell niche; spermatogenesis; immunotoxicity.

Введение

Острое или хроническое повреждение органов и тканей может приводить к развитию тяжелых заболеваний, для многих из которых в настоящее время не существует эффективных методов лечения. За восстановление поврежденных структур во взрослом организме ответственны главным образом постнатальные стволовые клетки. Однако при разрушении их специфического микроокружения (ниша стволовых клеток) эти клетки либо гибнут, либо не могут в полной мере выполнять свою функцию. Восстановление ниши — ключевой этап для успешной регенерации ткани. Активным участником поддержания и регенерации ниши в организме являются мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые обнаружены в составе ниш стволовых клеток практически во всех тканях, в том числе у человека. Механизмы, благодаря которым МСК оказывают регенераторные эффекты на нишу, очень разнообразны: от регуляторных сигналов, передаваемых резидентным клеткам ниши, и рекрутирования функциональных клеток в нишу до прямой дифференцировки в необходимые типы клеток [1]. Показано, что чаще всего регенераторное действие МСК осуществляется за счет секреции комплекса паракринных факторов (секретомы): факторов роста, хемокинов, цитокинов, молекул в составе внеклеточных везикул, компонентов внеклеточного матрикса [2]. На животных моделях повреждения ниши сперматогонияльных стволовых клеток (ССК) было показано, что введение секретомы МСК под белочную оболочку яичка способствует восстановлению функциональности ниши ССК и, как следствие, восстановлению сперматогенеза [3, 4]. Показанные регенераторные свойства секретомы МСК представляют собой перспективную основу для разработки биологического лекарственного препарата на его основе для лечения мужского бесплодия необструктивного генеза.

При изучении механизмов действия секретомы МСК установлено его влияние на основные резидентные клетки ниши: ССК, клетки Сертоли и клетки Лейдига. Однако зачастую важнейшим партнером МСК в самых различных тканеспецифичных нишах являются макрофаги [5]. МСК и макрофаги взаимно влияют друг на друга посредством межклеточных контактов, переноса органелл и секреции ряда растворимых факторов [6]. Известно, что макрофаги часто играют ключевую роль в реализации регенераторного потенциала МСК. Элиминация макрофагов в моделях повреждения легких, кишечника, почек, кожи значимо снижает положительный эффект введенного экзогенно секретомы МСК [7–9]. Таким образом, несмотря на доказанное прямое действие МСК на отдельные резидентные клетки в нишах, эффекты в отношении макрофагов также могут быть значимы.

Резидентные макрофаги присутствуют в норме во многих нишах стволовых клеток. По своему фе-

нотипу данные макрофаги близки к М2-типу, к которому традиционно относят макрофаги, обладающие противовоспалительными свойствами. При повреждениях, сопровождающихся асептическим воспалением, из кровеносного русла привлекаются моноциты, которые также могут дифференцироваться в М2-макрофаги [10]. Повышение числа макрофагов является необходимым этапом для успешного разрешения воспаления. Однако длительное поддержание числа М2-макрофагов на высоком уровне может приводить к развитию хронического воспаления и дальнейшему патологическому ремоделированию тканей [11, 12].

Гипотеза настоящего исследования состоит в том, что одним из регенераторных механизмов секретомы МСК может быть снижение количества М2-макрофагов в нише ССК. В исследовании были использованы две модели повреждения сперматогенеза: токсическое повреждение доксорубицином у мышей и двусторонний абдоминальный крипторхизм у крыс. Преимуществом данных моделей является комплексное и обратимое повреждение ниши ССК, что позволяет оценить регенераторное действие секретомы МСК на разные компоненты ниши ССК, включая макрофаги [13].

Несмотря на то, что локальное снижение избыточной иммунной активности в органе-мишени является важным условием успешной регенерации, уменьшение физиологического уровня активности иммунной системы организма (иммунотоксичность) может привести к нежелательным побочным эффектам. В данной работе мы также изучили влияние секретомы МСК на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у здоровых мышей, что необходимо для оценки безопасности секретомы МСК как основы для биологического лекарственного препарата.

Цель исследования — изучение влияния секретомы мезенхимных стромальных клеток на резидентные макрофаги на моделях повреждения ниши сперматогонияльных стволовых клеток и на перитонеальные макрофаги.

Материалы и методы

Выделение мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани человека

Мезенхимные стромальные клетки жировой ткани человека получены из биобанка Института регенеративной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, ID коллекции: MSU_MSC_AD (<https://human.depo.msu.ru>). Клетки культивировали в среде (Mesenchymal Stem Cell maintenance medium; AdvanceSTEM, США) с 10% питательных добавок (Stem Cell Growth Supplement; AdvanceSTEM, США). Среду меняли через 3 или 4 сут. Пассирование клеток выполняли до 4–5-го пассажа при достижении около 80% конфлюэнта.

Получение секрета мезенхимных стромальных клеток человека

Мезенхимные стромальные клетки жировой ткани, достигшие 80% конфлюентности, на 4–5-м пассаже трехкратно промывали раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия). Затем к клеткам добавляли среду DMEM с низкой концентрацией глюкозы (DMEM-LG; Thermo Fisher Scientific, США) и культивировали на протяжении 7 сут. Кондиционированную среду (секретом) собирали и центрифугировали 10 мин при 300 g для очистки от клеточного дебриса.

Концентрирование секрета мезенхимных стромальных клеток

Концентрирование проводили на фильтрах для центрифуги Vivaspin turbo 15 (Sartorius, Великобритания), имеющих размер пор, отсекающий молекулы размером меньше 10 кДа. Фильтры трижды промывали пропусканием через них 2% раствора пенициллина–стрептомицина в фосфатно-солевом буфере. Секретом МСК помещали в промытые фильтры и центрифугировали при температуре +4°C и скорости 3000 g до уменьшения объема раствора в 50 раз по сравнению с изначальным. Полученный концентрат собирали для дальнейших экспериментов.

Животные

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Моделирование двустороннего абдоминального крипторхизма. Работа была выполнена на взрослых крысах-самцах возрастом 3,5–4,0 мес. Для моделирования крипторхизма использовали отработанную ранее методику [3]. Данная модель является подходящей для создания обратимого повреждения ниши ССК [14]. Яички через паховый канал поднимали из мошонки в брюшную полость, затем фиксировали узловым швом к брюшной стенке в области латеральных каналов с помощью атравматической нити Prolene 4/0. Нить проходила через дистальный полюс яичка для предотвращения возможного блокирования сообщения между выносящим придатком яичка и семенными канальцами. Особое внимание уделяли исключению возможности захватывания швом кровеносных сосудов и семявыносящего протока. На 15-й день после начала эксперимента (через 2 нед) яички низводили в мошонку с помощью удаления фиксирующей лигатуры с последующим их смещением в паховый канал и параллельным введением испытуемого образца или препарата сравнения. Таким образом было сформировано 3 груп-

пы животных: «интактные» (без манипуляций), «повреждение» (с моделированным крипторхизмом, без инъекции), «секретом МСК» (введение животным с крипторхизмом секрета МСК в дозе 10 УЕ/животное). Секретом МСК вводили параллельно с низведением яичек крысам под белочную оболочку яичка в объеме 100 мкл в яичко. Перед введением секретом МСК смешивали с коллагеновым гелем «Аппликолл» (коллаген очищенный свиной I типа; «МакМеди», Россия) в соотношении 1:4. Через 1 мес или через 3 мес животных подвергали эвтаназии с помощью диоксида углерода (CO₂) с последующим контролем наступления смерти. Такие сроки выведения выбраны исходя из длительности цикла сперматогенеза, который у крыс составляет 54 дня. Выбранные сроки эвтаназии 1 мес (30 дней) и 3 мес (90 дней) позволяют оценить сперматогенез до и после прохождения полного цикла [15]. После эвтаназии у самцов выделяли яички для дальнейшего анализа.

Моделирование токсического повреждения сперматогенеза доксорубицином. Работа была выполнена на взрослых мышах-самцах линии C57Bl/6 возрастом 8–10 нед. В качестве повреждающего агента использовали доксорубин. Основным механизмом воздействия доксорубина является подавление синтеза ДНК и РНК: интеркаляция в двойную спираль ДНК между парами азотистых оснований, вследствие чего нарушается матрица и изменяется пространственная структура нуклеиновых кислот. В связи с этим доксорубин повреждает быстро делящиеся клетки, в том числе ССК, вызывая мужское бесплодие [16]. Преимуществом доксорубина для моделирования по сравнению с другими химиотерапевтическими агентами является воздействие на разные клетки ниши, что обеспечивает комплексность повреждения и возможность отразить плеiotропность действия секрета МСК. Кроме того, действие доксорубина является обратимым [13].

В пилотных исследованиях был выполнен подбор оптимальной дозы доксорубина. В результате гистологического анализа и анализа спермограммы установлено, что достаточным, но в то же время обратимым повреждением является доза 1 мг/кг. Препарат доксорубина гидрохлорид вводили внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг с периодичностью раз в два дня. Суммарная доза введенного препарата составила 10 мг/кг. Таким образом было сформировано 3 группы животных: «интактные» (без манипуляций), «повреждение» (с токсическим повреждением, без инъекции), «секретом МСК» (введение животным с токсическим повреждением секрета МСК в дозе 10 УЕ/животное). Секретом МСК вводили после курса доксорубина под белочную оболочку яичка в объеме 50 мкл в яичко. Перед введением его смешивали с коллагеновым гелем «Аппликолл» в соотношении 1:4. Через 5 нед или через 5 мес животные подверга-

лись эвтаназии с помощью диоксида углерода (CO₂) с последующим контролем наступления смерти. Такие сроки выбраны исходя из длительности цикла сперматогенеза, который у мышей составляет 5 нед (35 дней). Выбранные сроки эвтаназии соответствуют 1 циклу (35 дней) и 4–5 циклам (5 мес) сперматогенеза [14]. После эвтаназии у самцов выделяли яички для дальнейшего анализа.

Оценка фагоцитоза частиц латекса перитонеальными макрофагами мышей. Оценку влияния в группе «секретом МСК» на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов проводили в соответствии с рекомендациями по оценке иммунотоксических свойств лекарственных средств [17]. Работа была выполнена на здоровых взрослых мышах-самцах линии C57Bl/6 («СМК СТЕ3АР», Россия) возрастом 8–10 нед и массой 16–25 г. Было сформировано 3 экспериментальные группы: «интактные», «интактные + секретом МСК 250 УЕ/кг», «интактные + секретом МСК 416,5 УЕ/кг». Дозы в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» были рассчитаны таким образом, чтобы находиться ниже и выше терапевтической дозы (10 УЕ/животное), и составляли 7,5 и 12,5 УЕ/животное. При пересчете на массу тела мыши массой 30 г дозы для внутримышечного введения секрета МСК составляли: 250 УЕ/кг (7,5 УЕ/животное/30 г·1000 г) и 416,5 УЕ/кг (12,5 УЕ/животное/30 г·1000 г). Пересчет на массу животного в данном эксперименте необходим в связи с системным внутримышечным введением секрета МСК. Затем животным с введением секрета МСК однократно дробно (тремя частями с интервалом между введениями 1 ч) внутрибрюшинно на 8-й день исследования вводили 3 мл 3% тиогликолевой среды (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия) с целью увеличения количества выделяемых макрофагов.

На 11-й день эксперимента проводили отбор перитонеального экссудата. Для этого мышей на начальном этапе эвтаназировали с помощью диоксида углерода (CO₂) с последующей цервикальной дислокацией (конечный этап). Последующие процедуры осуществляли под ламинарным потоком воздуха для достижения максимально стерильных условий. Брюшную стенку обрабатывали 70% этанолом, затем на передней брюшной стенке срезали кожу. В брюшную полость с помощью шприца вводили 10 мл физиологического раствора комнатной температуры. Брюшную полость массировали, затем шприцем отбирали экссудат в пробирки объемом 15 мл. Процедуру повторяли 5–6 раз, только при этом вводимый объем физиологического раствора составлял 5 мл. Пробирки с экссудатом центрифугировали на центрифуге CM-6MT (ELMI SIA, Латвия) в течение 10 мин при 300 g.

Изучение фагоцитарной активности макрофагов

Осадок ресуспендировали в среде DMEM с L-глутамином (серия ДМ-21-02 HS; «Биолот», Россия), содержащей 10% FBS (серия RE0000002; HyClone, США) в объеме 10 мл. Используя гематологический анализатор Mythic 18 Vet (Orphee, Швейцария), определяли абсолютное количество макрофагов. В среднем у мышей выделяли около 30 млн макрофагов. Для дальнейших процедур в стерильных условиях выкладывали по два покровных стекла на дно чашек Петри. Суспензию клеток от каждого животного в объеме 10 мл переливали в чашки Петри (от каждого животного по 1 чашке Петри) и помещали в CO₂-инкубатор в условия 37°C и 5% CO₂ на 2 ч. Во время инкубации готовили среду DMEM с содержанием частиц латекса диаметром 1 мкм, конъюгированных с FITC (серия MKCL6564; Sigma-Aldrich, США), из расчета 100 частиц латекса на 1 макрофаг. Неадгезированные клетки сливали. Оставшиеся клетки промывали четырежды 10 мл физиологического раствора, затем добавляли 10 мл среды с латексными частицами и инкубировали 3 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. После инкубации чашки Петри промывали 4 раза физиологическим раствором в объеме 10 мл. Покровные стекла окрашивали по методу Романовского–Гимзе (для удобства окраску проводили непосредственно в чашке) и высушивали при комнатной температуре.

Для флуоресцентного анализа в чашки Петри добавляли 5 мл раствора трипанового синего (0,8 мг/мл), инкубировали в течение 1 мин для устранения флуоресценции частиц, оказавшихся снаружи клеток. После процедуры инактивирования флуоресценции покровное стекло помещали на предметное и проводили микроскопический анализ с использованием флуоресцентной (поглощение 495 нм, испускание 517 нм) и световой микроскопии (микроскоп Axio Lab.A1; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Подсчитывали количество частиц, поглощенных 100 макрофагами. Учитывали количество частиц для каждого проанализированного макрофага. Вычисляли индекс фагоцитарной активности, равный отношению общего количества поглощенных частиц латекса и количества макрофагов.

Иммуногистохимические методы

Яички, полученные от животных после эвтаназии, фиксировали в 10% растворе формалина, выдерживали 24 ч, а затем заливали в парафин. После делали поперечные срезы толщиной 1 мкм, депарафинизировали последовательным перемещением в более разбавленный спиртовой раствор. Демаскирование проводили в 0,1 М цитратном буфере, выдерживая образцы 20 мин при температуре 98°C. Мечение ткани осуществляли антителами в соответствии с протоколами производителей. В эксперименте использованы следующие красители и антитела: DAPI (Sigma,

Германия) — маркер ДНК; CD206 (ab64693; Abcam, США) и CD163 (ab182422; Abcam, США) — маркеры M2-макрофагов.

Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DM600B, снабженного камерой Leica DFC 420X (Leica Microsystems, Германия). Для обсчета получали не менее 5 репрезентативных фотографий с одного препарата. Обработку и анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения LasX (Leica Microsystems, Германия) и Fiji.

Статистический анализ

В соответствии с описательной статистикой данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro-Wilk's W test). При нормальном распределении рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Для данных, не соответствующих нормальному распределению, были посчитаны медиана (Me) и квартильный размах [Q1; Q3]. Межгрупповые сравнения проводили параметрическими или непараметрическими методами после получения данных о типе распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением (post hoc) с использованием теста Тьюки применяли для оценки данных с нормальным распределением. Для данных,

не соответствующих нормальному распределению, осуществляли попарное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для статистического анализа использовали программное обеспечение Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты

Секретом МСК не влияет на количество CD163⁺ M2-макрофагов в интерстициальном пространстве в модели крипторхизма на ранних сроках повреждения через 1 мес после инъекции секретом МСК.

Для изучения влияния секрета МСК на содержание макрофагов в семенниках при повреждении у крыс моделировали двусторонний абдоминальный крипторхизм. Подъем яичек в брюшную полость на 2 нед приводил к существенному нарушению сперматогенного эпителия, гиперплазии интерстиция и значимому увеличению числа CD163⁺ M2-макрофагов в интерстициальном пространстве. Ранее мы показали, что введение секрета МСК под белочную оболочку яичка способствует восстановлению структуры и функции ниши ССК [3]. На ранних сроках количество CD163⁺ M2-макрофагов в семенниках животных с крипторхизмом, которым локально вводили секретом МСК, значимо не снижается (рис. 1).

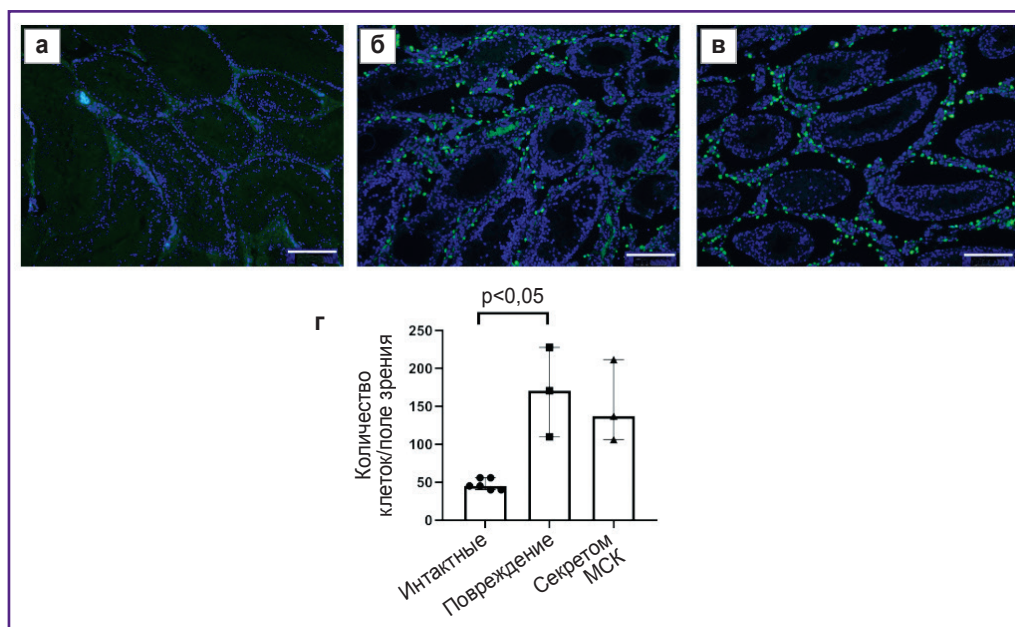


Рис. 1. Срезы тканей самцов крыс через 1 мес после введения секрета МСК:

а–в — иммуногистохимическое окрашивание специфическими антителами к CD163⁺; синий псевдоцвет — DAPI, маркер нуклеиновых кислот; зеленый псевдоцвет — CD163⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; а — «интактные» (без манипуляций); б — «повреждение» (с моделированным крипторхизмом, без инъекции); в — «секретом МСК» (введение животным с крипторхизмом секрета МСК); г — количество CD163⁺ M2-макрофагов в поле зрения; количество исследуемых семенников в группе «интактные» — 6, в группах «повреждение» и «секретом МСК» — 3. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентили; для каждого среза анализировали не менее 5 полей зрения. Бар — 200 мкм

Секретом МСК способствует снижению числа CD163⁺ M2-макрофагов в интерстициальном пространстве в модели крипторхизма на поздних сроках через 3 мес после инъекции секрета МСК.

На поздних сроках в модели крипторхизма через 3 мес после введения секрета МСК мы наблюдали снижение количества CD163⁺ M2-макрофагов в семенниках животных, что может являться значимым механизмом действия секрета МСК, опосредующим стимуляцию восстановления ниши (рис. 2).

Секретом МСК не влияет на количество M2-макрофагов в интерстициальном пространстве в модели токсического повреждения доксорубицином на ранних сроках повреждения через 5 нед после инъекции секрета МСК.

Для подтверждения нашей гипотезы о влиянии секрета МСК на содержание M2-макрофагов в

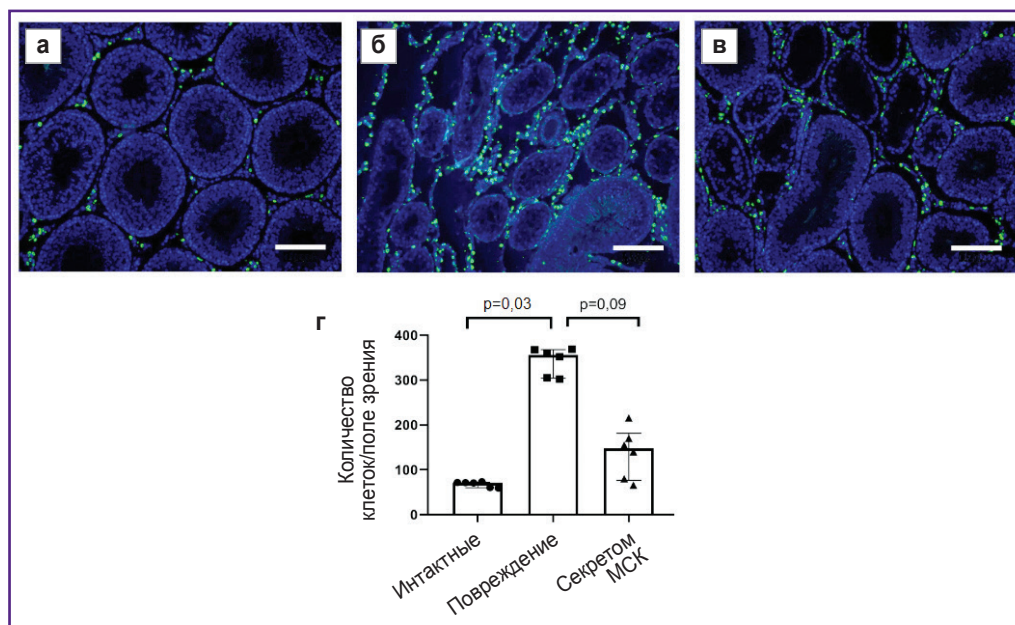


Рис. 2. Срезы тканей самцов крыс через 3 мес после введения секрета МСК:

а–в — иммуногистохимическое окрашивание специфическими антителами к CD163⁺; синий псевдоцвет — DAPI, маркер нуклеиновых кислот; зеленый псевдоцвет — CD163⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; а — «интактные» (без манипуляций); б — «повреждение» (с моделированным крипторхизмом, без инъекции); в — «секретом МСК» (введение животным с крипторхизмом секрета МСК); г — количество CD163⁺ M2-макрофагов в поле зрения; количество исследуемых семенников в каждой группе — 6. Результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиля; для каждого среза анализировали не менее 5 полей зрения. Бар — 200 мкм

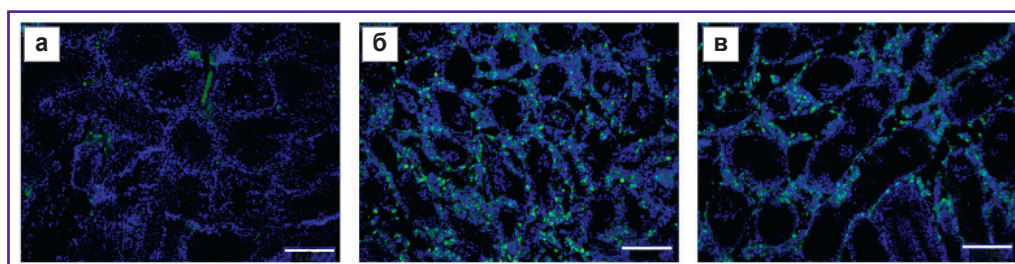
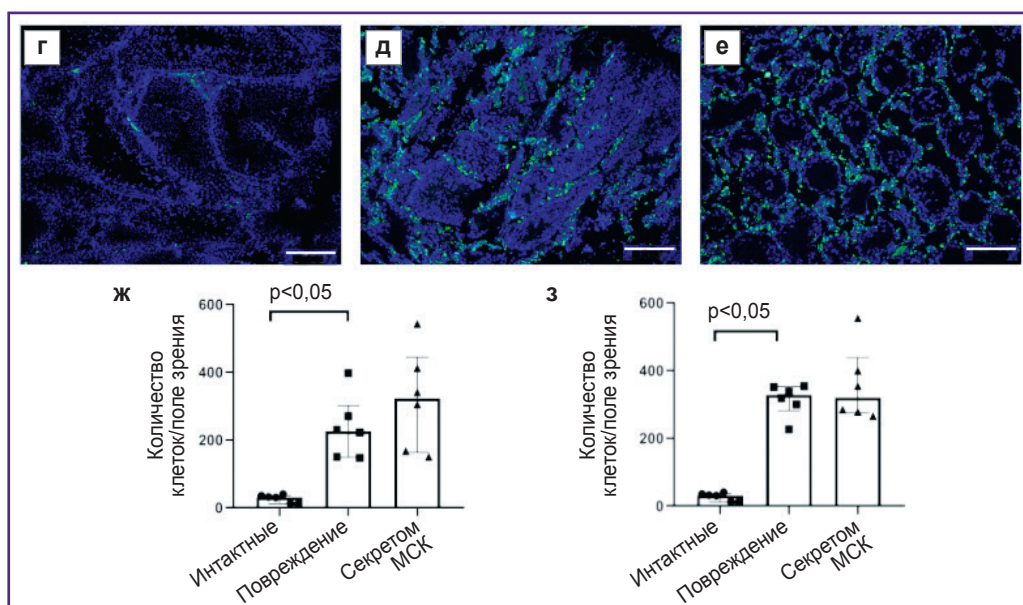


Рис. 3. Срезы тканей самцов мышей через 5 нед после введения секрета МСК:

а–е — иммуногистохимическое окрашивание специфическими антителами к CD206⁺ и CD163⁺; синий псевдоцвет — DAPI, маркер нуклеиновых кислот; зеленый псевдоцвет — CD206⁺ и CD163⁺ M2-макрофаги; а–в — CD206⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; г–е — CD163⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; а и г — «интактные» (без манипуляций); б и д — «повреждение» (с токсическим повреждением, без инъекции секрета МСК); в и е — «секретом МСК» (введение животным с токсическим повреждением секрета МСК); ж и з — количество CD163⁺ и CD206 M2-макрофагов в поле зрения соответственно; количество исследуемых семенников в каждой группе — 6; результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиля; для каждого среза анализировали не менее 5 полей зрения. Бар — 200 мкм. См. окончание



Окончание рис. 3

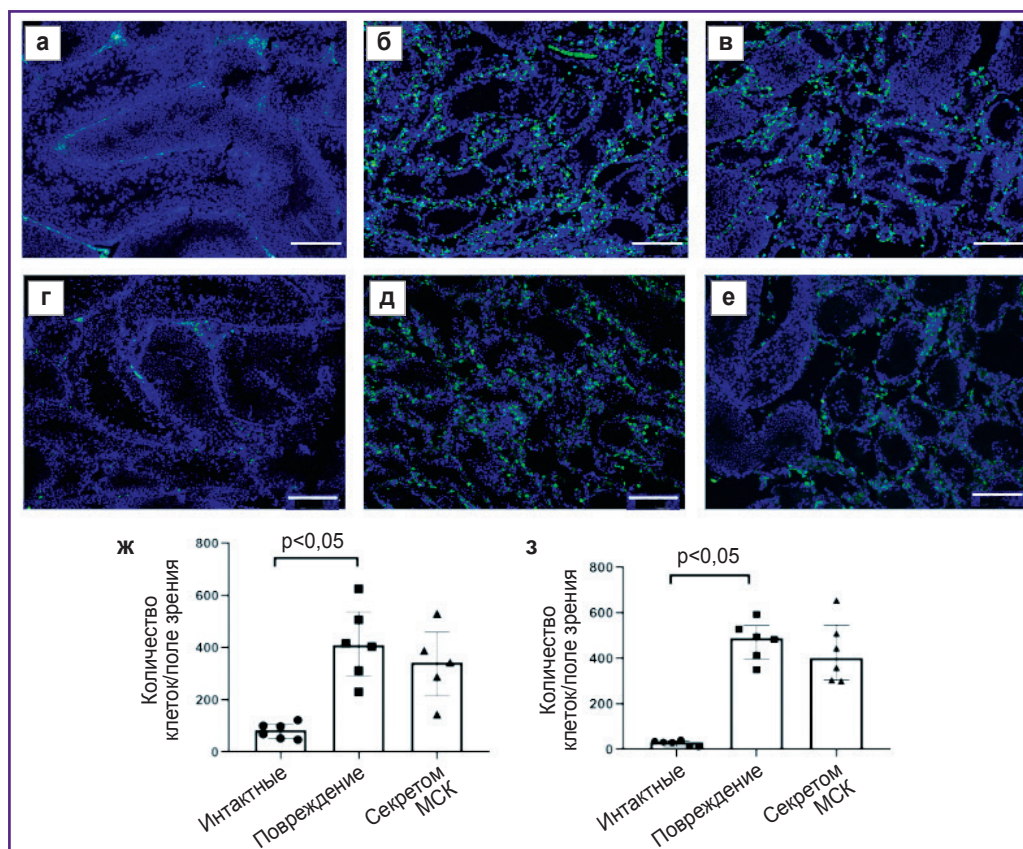


Рис. 4. Срезы тканей самцов мышей через 5 мес после введения секрета МСК:

а–е — иммуногистохимическое окрашивание специфическими антителами к CD206⁺ и CD163⁺; синий псевдоцвет — DAPI, маркер нуклеиновых кислот; зеленый псевдоцвет — CD206⁺ и CD163⁺ M2-макрофаги; а–в — CD206⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; г–е — CD163⁺ M2-макрофаги, преимущественно находятся в интерстициальном пространстве; а и г — «интактные» (без манипуляций); б и д — «повреждение» (с токсическим повреждением, без инъекции секрета МСК); в и е — «секретом МСК» (введение животным с токсическим повреждением секрета МСК); ж и з — количество CD163⁺ и CD206 M2-макрофагов в поле зрения соответственно; количество исследуемых семенников в каждой группе — 6; результаты представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиля; для каждого среза анализировали не менее 5 полей зрения. Бар — 200 мкм

поврежденной нише ССК мы смоделировали токсическое повреждение сперматогенеза доксорубицином у мышей. После курса инъекций доксорубицина количество CD163⁺ M2-макрофагов через 5 нед в интерстиции яичек значимо увеличилось. Однако локальное введение секрета МСК не повлияло на количество макрофагов (рис. 3, ж). Мы также проанализировали содержание M2-макрофагов в семенниках, используя другой классический маркер M2-макрофагов — CD206, и получили аналогичные результаты: при повреждении доксорубицином количество CD206⁺ M2-макрофагов также значимо увеличилось, а введение секрета МСК не изменяло число CD206⁺ M2-макрофагов (рис. 3, з).

Секретом МСК не влияет на количество M2-макрофагов на поздних сроках повреждения в модели токсического повреждения доксорубицином.

Для того чтобы убедиться, что введение секрета МСК под белочную оболочку яичка мышам с моделью токсического повреждения сперматогенеза не оказывает влияния на содержание M2-макрофагов на более поздних сроках, мы проанализировали срезы семенников через 5 мес после его локального введения. Обнаружено, что количество M2-макрофагов в поврежденной нише ССК было также значимо выше по сравнению с интактными животными, однако введение секрета МСК значимо не влияло на их количество (рис. 4).

Секретом МСК не обладает иммунотоксичностью по отношению к макрофагам.

Изучение фагоцитарной активности макрофагов было проведено с помощью классического теста для оценки неспецифического звена иммунного ответа с использованием поглощения частиц латекса, конъюгированных с FITC. Установлено, что одно-

кратное внутримышечное введение секрета МСК в дозах 250 УЕ/кг (7,5 УЕ/животное) и 416,5 УЕ/кг (12,5 УЕ/животное) не снижало активность системных перитонеальных макрофагов, а, наоборот, увеличивало их фагоцитарную активность (рис. 5).

Обсуждение

Макрофаги являются важными поддерживающими клетками во многих нишах стволовых клеток. В нише ССК также обнаружены M2-макрофаги, ведущая роль которых состоит в регуляции других клеток и обеспечении иммунопривилегированности ниши ССК [18]. На двух различных моделях повреждения ниши ССК мы показали, что при повреждении количество M2-макрофагов, положительных по маркерам CD163 и CD206, в интерстициальном пространстве значимо возрастает. Наши данные хорошо согласуются с данными других авторов, которые утверждают, что количество M2-макрофагов в других моделях повреждения сперматогенеза также значительно увеличивается по сравнению с интактными животными [19–21]. При этом показано, что при введении секрета МСК под белочную оболочку яичка в модели крипторхизма у крыс снижается число CD163⁺ M2-макрофагов на поздних сроках, что ассоциировано с восстановлением структуры ниши и репродуктивной функции самцов [3]. Однако в модели токсического повреждения у мышей количество CD163⁺ и CD206⁺ M2-макрофагов значимо не меняется как на ранних, так и на поздних сроках. Отсутствие эффекта на M2-макрофаги может быть связано с отличиями моделей и патогенеза повреждения ниши ССК при используемых воздействиях. Так, при введении доксорубицина повреждение семенных канальцев оказалось более выраженным, чем при крипторхизме. В нашей предыдущей работе [4] показано, что в модели токсического повреждения сперматогенеза, несмотря на то что после введения секрета МСК количество сперматозоидов значимо увеличивается, количество нормальных и восстанавливающихся канальцев значимо не отличается от группы животных без лечения. В то же время в модели крипторхизма при введении секрета МСК количество поврежденных канальцев снижается, а число нормальных и восстанавливающихся значимо возрастает [3]. Таким образом, две модели показывают разный уровень восстановления ниши ССК, а следовательно, клеточные механизмы восстановления ниши под действием секрета МСК, по-видимому, также могут различаться, что требует дальнейшего изучения.

Макрофаги могут быть не только прямой мишенью секрета МСК, но и посредниками в реализации его эффектов на другие клетки ниши ССК. Рядом авторов [22–24] было показано ингибирующее действие макрофагов *in vitro* на секреторную активность и устройство цитоскелета клеток Лейдига. Так, снижение числа макрофагов после введения секрета

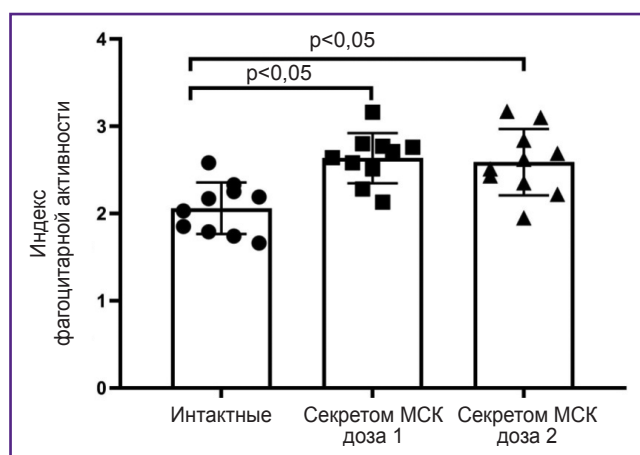


Рис. 5. Индекс фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Количество животных в каждой группе — 10. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение; доза 1 — 250 УЕ/кг (7,5 УЕ/животное); доза 2 — 416,5 УЕ/кг (12,5 УЕ/животное)

МСК может способствовать увеличению секреторной активности клеток Лейдига, что также важно для нормального функционирования ниши ССК.

В данном исследовании продемонстрировано, что секретом МСК не снижает функциональную активность перитонеальных макрофагов. Более того, их фагоцитарная активность значимо возрастала в группах животных, получающих секретом МСК. Поскольку секретом МСК в своем составе содержит компоненты человеческого происхождения, увеличение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мыши может быть связано с естественной иммунной реакцией организма экспериментальных животных в ответ на введение чужеродных белков.

Заключение

Секретом МСК показал локальную активность в отношении M2-макрофагов на модели крипторхизма у крыс. В поврежденной нише ССК при локальном введении секрета МСК снижается количество M2-макрофагов, что может вносить значимый вклад в восстановление ниши. Однако этот эффект, по-видимому, зависит от генеза и степени повреждения ниши ССК. Важно отметить, что секретом МСК не ингибирует функциональную активность перитонеальных макрофагов, не оказывая токсичного действия на макрофагальный компонент иммунной системы. Полученные данные о влиянии секрета МСК на M2-макрофаги и отсутствии иммунотоксичности имеют важное значение для дальнейшей трансляции его в клиническую практику.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Efimenko A.Y., Tkachuk V.A. Mesenchymal stromal cells as critical contributors to tissue regeneration. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 576176, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576176>.
2. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., Efimenko A. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *Int J Mol Sci* 2019; 20(7): 1656, <https://doi.org/10.3390/ijms20071656>.
3. Sagaradze G., Basalova N., Kirpatovsky V., Ohobotov D., Nimiritsky P., Grigorieva O., Popov V., Kamalov A., Tkachuk V., Efimenko A. A magic kick for regeneration: role of mesenchymal stromal cell secretome in spermatogonial stem cell niche recovery. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 342, <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1479-3>.
4. Monakova A., Sagaradze G., Basalova N., Popov V., Balabanyan V., Efimenko A. Novel potency assay for MSC

secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker. *Int J Mol Sci* 2022; 23(16): 9414, <https://doi.org/10.3390/ijms23169414>.

5. Pajarinen J., Lin T., Gibon E., Kohno Y., Maruyama M., Nathan K., Lu L., Yao Z., Goodman S.B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 2019; 196: 80–89, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>.

6. Lu D., Xu Y., Liu Q., Zhang Q. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and maintenance of inflammatory microenvironment homeostasis. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 681171, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.681171>.

7. Willis G.R., Fernandez-Gonzalez A., Anastas J., Vitali S.H., Liu X., Ericsson M., Kwong A., Mitsialis S.A., Kourembanas S. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 197(1): 104–116, <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-0925OC>.

8. Galipeau J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: the emerging role of chemokine cooperativity. *Stem Cells* 2021; 39(9): 1145–1154, <https://doi.org/10.1002/stem.3380>.

9. He X., Dong Z., Cao Y., Wang H., Liu S., Liao L., Jin Y., Yuan L., Li B. MSC-derived exosome promotes M2 polarization and enhances cutaneous wound healing. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 7132708, <https://doi.org/10.1155/2019/7132708>.

10. Koncz G., Jenei V., Tóth M., Váradi E., Kardos B., Bácsi A., Mázló A. Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation. *Front Immunol* 2023; 14: 1169560, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1169560>.

11. Wang M., Yang Y., Cansever D., Wang Y., Kantores C., Messiaen S., Moison D., Livera G., Chakarov S., Weinberger T., Stremmel C., Fijak M., Klein B., Pleuger C., Lian Z., Ma W., Liu Q., Klee K., Händler K., Ulas T., Schlitzer A., Schultze J.L., Becher B., Greter M., Liu Z., Ginhoux F., Epelman S., Schulz C., Meinhardt A., Bhushan S. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(1): e2013686117, <https://doi.org/10.1073/pnas.2013686117>.

12. Mahi-Brown C.A., Tung K.S. Activation requirements of donor T cells and host T cell recruitment in adoptive transfer of murine experimental autoimmune orchitis (EAO). *Cell Immunol* 1989; 124(2): 368–379, [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90138-x](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90138-x).

13. Sagaradze G., Monakova A., Basalova N., Popov V., Balabanyan V., Efimenko A. Regenerative medicine for male infertility: a focus on stem cell niche injury models. *Biomed J* 2022; 45(4): 607–614, <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.01.015>.

14. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Kirpatovsky V.I., Ohobotov D.A., Grigorieva O.A., Balabanyan V.Y., Kamalov A.A., Efimenko A.Y. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 1428–1436, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.174>.

15. Perrard M.H., Sereni N., Schluth-Bolard C.,

Blondet A., D Estaing SG, Plotton I., Morel-Journel N., Lejeune H., David L., Durand P. Complete human and rat ex vivo spermatogenesis from fresh or frozen testicular tissue. *Biol Reprod* 2016; 95(4): 89, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142802>.

16. Охоботов Д.А., Сагарадзе Г.Д., Монакова А.О., Басалова Н.А., Балабаньян В.Ю., Попов В.С., Кирпатовский В.И., Нестерова О.Ю., Ефименко А.Ю., Камалов А.А. Моделирование нарушений сперматогенеза химиотерапевтическими средствами — цисплатином и доксорубицином. *Экспериментальная и клиническая урология* 2021; 14(4): 95–101.

Okhobotov D.A., Sagaradze G.D., Monakova A.O., Basalova N.A., Balabanyan V.U., Popov V.S., Kirpatovskiy V.I., Nesterova O.Yu., Efimenko A.Yu., Kamalov A.A. Simulation of spermatogenesis disorders with chemotherapeutic agents — cisplatin and doxorubicin. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya* 2021; 14(4): 95–101.

17. Кастирнова А.Е., Коротченко Е.С., Крышень К.Л., Ацапкина А.А., Бекетова Д.Д., Макарова М.Н. Рекомендации по оценке иммунотоксических свойств лекарственных средств. Фагоцитарная активность макрофагов. *Международный вестник ветеринарии* 2014; 1: 85–91.

Kastornova A.E., Korotchenko E.S., Kryshen K.L., Atsapkina A.A., Beketova D.D., Makarova M.N. Practical guidance for immunotoxicity of new medications. Phagocytic activity of peritoneal macrophages. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii* 2014; 1: 85–91.

18. Mossadegh-Keller N., Sieweke M.H. Testicular

macrophages: guardians of fertility. *Cell Immunol* 2018; 330: 120–125, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.009>.

19. Chen Q., Deng T., Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59: 157–165, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.019>.

20. Achua J.K., Chu K.Y., Ibrahim E., Khodamoradi K., Delma K.S., Iakymenko O.A., Kryvenko O.N., Arora H., Ramasamy R. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections on testis. *World J Mens Health* 2021; 39(1): 65–74, <https://doi.org/10.5534/wjmh.200170>.

21. Zheng W., Zhang S., Jiang S., Huang Z., Chen X., Guo H., Li M., Zheng S. Evaluation of immune status in testis and macrophage polarization associated with testicular damage in patients with nonobstructive azoospermia. *Am J Reprod Immunol* 2021; 86(5): e13481, <https://doi.org/10.1111/aji.13481>.

22. Sun X.R., Hedger M.P., Risbridger G.P. The effect of testicular macrophages and interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under in vitro maintenance conditions. *Endocrinology* 1993; 132(1): 186–192, <https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419122>.

23. Bhushan S., Meinhardt A. The macrophages in testis function. *J Reprod Immunol* 2017; 119: 107–112, <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.06.008>.

24. Bilińska B., Kmicikiewicz I., Pierściński A., Sadowska J. The effect of testicular macrophages, macrophage-conditioned medium and interleukin-1 alpha on the cytoskeleton of bank vole Leydig cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107(5): 281–287, <https://doi.org/10.1055/s-0029-1212113>.