

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ M2-ПОДОБНЫХ МАКРОФАГОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭФФЕРОЦИТОЗОМ

**Максимова А.А.,
Тыринова Т.В.,
Сахно Л.В.,
Тихонова М.А.,
Шевела Е.Я.,
Останин А.А.,
Черных Е.Р.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (630099, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
**Максимова Александра
Александровна**
e-mail: parkinson.dses@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Ранее в нашей лаборатории был разработан протокол получения макрофагов с выраженной противовоспалительной и репаративной/нейрорегенераторной активностью, поляризующим фактором для которых является взаимодействие с апоптотическими клетками – эффероцитоз (M2(Eff)). Благодаря уникальному секретому данные клетки являются перспективными кандидатами для клеточной терапии заболеваний, ассоциированных с нейровоспалением. Однако экспрессия ингибиторных рецепторов PD-1 и TIM-3 на M2(Eff) и их связь с продукцией цитокинов остается невыясненной.

Цель. Охарактеризовать экспрессию PD-1 и TIM-3 на макрофагах M2(Eff) и определить их роль в регуляции продукции про- и противовоспалительных цитокинов (IL-10 и TNF-α).

Материалы и методы. Макрофаги получали из моноцитов периферической крови здоровых доноров. Экспрессию PD-1 и TIM-3, а также продукцию IL-10 и TNF-α анализировали методом проточной цитометрии. Для оценки вклада PD-1 и TIM-3 в цитокин-секреторную активность клетки предварительно обрабатывали соответствующими блокирующими антителами и далее определяли внутриклеточный уровень IL-10 и TNF-α.

Результаты. M2(Eff) отличались более высоким уровнем PD-1 и TIM-3 по сравнению с M1 культурами, преимущественно за счет клеток с сочетанной экспрессией данных маркеров, а также более высоким PD-1 и более низким TIM-3 по сравнению с «классическими» M2 макрофагами, поляризованными интерлейкином 4. Доля IL-10+ клеток была выше в культурах M2(Eff), экспрессирующих PD-1, а также в TIM-3-экспрессирующих клетках после стимуляции макрофагов липополисахаридом по сравнению с оппозитными популяциями. Уровень TNF-α был выше в TIM-3+ макрофагах. Блокирование PD-1 на этапе стимуляции липополисахаридом увеличивало долю TNF-α+ клеток, тогда как блокирование TIM-3 не оказывало такого эффекта.

Заключение. Макрофаги M2(Eff) характеризуются уникальным профилем экспрессии PD-1 и TIM-3, и эти молекулы ассоциированы с продукцией цитокинов IL-10 и TNF-α.

Ключевые слова: макрофаги, чек-поинт, цитокины, PD-1, TIM-3, проточная цитометрия

Статья поступила: 31.03.2026
Статья принята: 26.08.2026
Статья опубликована: 09.10.2026

Для цитирования: Максимова А.А., Тыринова Т.В., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Взаимосвязь между экспрессией контрольных точек иммунитета и цитокинового профиля M2-подобных макрофагов, индуцированных эффероцитозом. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 205-214. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.21

ASSOCIATION BETWEEN IMMUNE CHECKPOINT EXPRESSION AND THE CYTOKINE PROFILE OF M2-LIKE MACROPHAGES INDUCED BY EFFEROCYTOSIS

**Maksimova A.A.,
Tyrinova T.V.,
Sakhno L.V.,
Tikhonova M.A.,
Shevela E.Ya.,
Ostanin A.A.,
Chernykh E.R.**

Federal State Budgetary Scientific
Institution «Research Institute
of Fundamental and Clinical Immunology»
(Yadrintsevskaya str., 14, Novosibirskaya
obl., Novosibirsk 630099, Russian
Federation)

Corresponding author:
Aleksandra A. Maksimova
e-mail: parkinson.dses@gmail.com

ABSTRACT

Background. We previously developed a protocol for generating macrophages with pronounced anti-inflammatory and reparative/neuroregenerative activity, polarized by efferocytosis (M2(Eff)). Due to their unique secretome, these cells are promising candidates for cell therapy of neuroinflammatory diseases. However, the expression of the inhibitory receptors PD-1 and TIM-3 on M2(Eff) and its relationship with cytokine production remain unclear.

Aim. To characterize PD-1 and TIM-3 expression on M2(Eff) macrophages and determine their role in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production (IL-10 and TNF- α).

Materials and methods. Macrophages were differentiated from peripheral blood monocytes of healthy donors. PD-1 and TIM-3 expression, as well as IL-10 and TNF- α production, were assessed by flow cytometry. To evaluate the contribution of PD-1 and TIM-3 to cytokine secretion, cells were pre-treated with blocking antibodies, followed by assessment of intracellular IL-10 and TNF- α levels.

Results. M2(Eff) exhibited higher PD-1 and TIM-3 levels compared to M1 cultures, primarily due to cells co-expressing both markers. M2(Eff) also had higher levels of PD-1 and lower levels of TIM-3 compared to "classical" M2 macrophages polarized by IL-4. The proportion of IL-10-positive cells was higher in M2(Eff) cultures expressing PD-1, as well as in TIM-3-expressing cells after lipopolysaccharide stimulation, compared to the negative populations. TNF- α levels were higher in TIM-3-positive macrophages compared to TIM-3-negative ones. PD-1 blockade during lipopolysaccharide stimulation increased the proportion of TNF- α -expressing cells, whereas TIM-3 blockade had no such effect.

Conclusion. M2(Eff) macrophages induced by apoptotic cells display a unique PD-1 and TIM-3 expression profile. Moreover, PD-1 and TIM-3 are associated with IL-10 and TNF- α production.

Key words: Macrophages, Immune Checkpoint Proteins, Cytokines, Programmed Cell Death 1 Receptor (PD-1), HAVCR2 protein (TIM-3), Flow Cytometry

Received: 31.03.2026
Accepted: 26.08.2026
Published: 09.10.2026

For citation: Maksimova A.A., Tyrinova T.V., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Association between immune checkpoint expression and the cytokine profile of M2-like macrophages induced by efferocytosis. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(4): 205-214. doi: 10.29413/ABS.2026-11.4.21

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие изучение контрольных точек иммунитета (immune checkpoints/чек-поинт молекулы) произвело революцию в понимании механизмов иммунной регуляции и открыло новые горизонты в терапии злокачественных новообразований и хронических воспалительных заболеваний. Классически ингибиторные иммунные чек-поинты рассматриваются как ключевые негативные регуляторы Т-клеточного ответа, обеспечивающие поддержание периферической толерантности и предотвращающие развитие аутоиммунных реакций [1]. Однако накопленные за последние годы данные свидетельствуют о том, что функциональная роль иммунных чек-поинтов не ограничивается лимфоцитами. Экспрессия белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), гликопротеина цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4), белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и молекулы, содержащей Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен-3 (TIM-3) была обнаружена на клетках миелоидного происхождения, таких как дендритные клетки, моноциты и макрофаги, где их роль выходит за рамки простого подавления Т-клеточного ответа. В дендритных клетках сигнальные пути, ассоциированные с TIM-3 и PD-1, играют важную роль в регуляции созревания, презентации антигена и противоопухолевом иммунитете [2–4]. В моноцитах экспрессия TIM-3 связана с балансом продукции про- и противовоспалительных цитокинов [5, 6]. В макрофагах экспрессия PD-1 ассоциирована с M2-фенотипом, который характеризуется выраженной противовоспалительной активностью [7, 8]. Кроме того, PD-1/PD-L1 ось в макрофагах регулирует синтез цитокинов, например, IFN- γ [9]. TIM-3 также может модулировать цитокин-продуцирующую функцию макрофагов, влияя на их про- и противовоспалительный потенциал [9]. Помимо этого, TIM-3 участвует в фагоцитозе, в том числе в распознавании и элиминации апоптотических клеток, что имеет ключевое значение для поддержания тканевого гомеостаза и разрешения воспаления [10, 11].

Вместе с тем, большинство работ сосредоточено на изучении отдельных чек-поинт молекул, в то время как их сочетанная экспрессия и взаимосвязь с функциональным фенотипом макрофагов, особенно в контексте различных поляризующих сигналов, остаются недостаточно исследованными.

Ранее нами был разработан протокол получения M2-подобных макрофагов с выраженной противовоспалительной и репаративной/нейрорегенераторной активностью, поляризующим фактором для которых является эффероцитоз (Eff.) — то есть, взаимодействие с апоптотическими клетками (M2(Eff)). В составе секрета этих клеток выявлено большое количество анализов, включая цитокины, хемокины, ростовые и ангиогенные факторы, металлопротеиназы и др., что позволило обосновать их использование в качестве перспективных кандидатов для лечения заболеваний, ассоциированных с нейровоспалением [12].

Однако особенности экспрессии PD-1 и TIM-3 на макрофагах, поляризованных эффероцитозом, а также связь этих рецепторов с продукцией цитокинов остается невыясненной. Учитывая имеющиеся данные о важной роли этих молекул в регуляции функций миелоидных клеток, выяснение этого вопроса имеет важное значение, в том числе для оптимизации подходов к клеточной терапии.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящей работы являлась характеристика экспрессии PD-1 и TIM-3 на макрофагах M2(Eff) и оценка значимости этих рецепторов в регуляции продукции про- и противовоспалительных цитокинов на примере IL-10 и TNF- α .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 30 условно здоровых доноров в возрасте 26–67 лет. Исследование было выполнено в соответствии с этическими требованиями и одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 144 от 21.02.24). Все доноры подписали добровольное информированное согласие.

Генерация макрофагов. M2(Eff) макрофаги получали по оригинальному протоколу НИИФКИ. Для этого мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови доноров выделяли с помощью центрифугирования в плотности фиколла-верографина, помещали в количестве $3\text{--}5 \times 10^6/\text{мл}$ в культуральные планшеты (TPP, Швейцария) и культивировали в присутствии 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF (SCI Store, Россия) в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1 % незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США) и 2 % аутоплазмы (дефицит сывороточных факторов, индуцирующих апоптоз неадгезивной фракции МНК). Через 18 ч неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивные клетки продолжали культивировать в описанной выше среде в течение 7 дней. Неполяризованные M0, а также поляризованные M1 и M2 макрофаги получали классическим методом: МНК в количестве $3\text{--}5 \times 10^6/\text{мл}$ помещали в культуральные планшеты (TPP, Швейцария) и культивировали в присутствии 50 нг/мл рекомбинантного GM-CSF (SCI Store, Россия) в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанолом, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1 % незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США) и 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США). Через 1 час удаляли неадгезивную фракцию клеток, а оставшиеся клетки культивировали при 37°C с 5 % CO₂ в течение 7 дней. На 5-й день добавляли поляризующие стимулы: липополисахарид (LPS E.colli 0114:B4, 10 мкг/мл) для генерации макрофагов M1 и IL-4, (20 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) – для генерации макрофагов M2. К культурам M0

макрофагов не добавляли поляризующие стимулы, оставляя неполяризованными. По завершении культивирования, макрофаги получали при помощи механической диссоциации (жизнеспособность клеток составляла не менее 90 % по исключению трипанового синего).

Оценка экспрессии чек-поинт рецепторов.

Для оценки экспрессии ингибиторных молекул использовали многоцветную проточную цитометрию. Полученные макрофаги окрашивали флуоресцентно-меченными моноклональными антителами (anti-PD-1-APC (BD Biosciences, США), anti-TIM-3-PE (Sony, США), anti-HLA-DR-PerCP (Beckman Coulter, США)) и далее проводили оценку экспрессии ингибиторных чек-поинт молекул в гейте HLA-DR⁺ клеток с помощью проточного цитометра DxFLEX (Beckman Coulter, США).

Оценка продукции цитокинов. Для оценки уровня внутриклеточных цитокинов макрофаги M2(Eff) стимулировали LPS (10 мкг/мл) в течение 4 часов. Контролем являлись нестимулированные клетки, к которым не добавляли LPS. За 1 ч до окончания культивирования добавляли брефельдин А (5 мг/мл, Sony, США) для блокирования высвобождения цитокинов. Далее клетки отмывали, окрашивали поверхностными моноклональными антителами (anti-PD-1-APC (BD Biosciences, США), anti-TIM-3-PE (Sony, США), anti-HLA-DR-PerCP (Beckman Coulter, США)), а после этого – внутриклеточными (anti-TNF- α -FITC и anti-IL-10-FITC (все BD Biosciences, США)) с использованием наборов для пермеабилзации True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США). Оценку продукции IL-10 и TNF- α проводили в гейте HLA-DR⁺ клеток, а также в популяциях, оппозитных по экспрессии PD-1 и TIM-3 с помощью проточного цитометра DxFLEX (Beckman Coulter, США).

Блокирование PD-1 и TIM-3. Для экспериментов с блокирующими антителами перед стимуляцией LPS клетки предварительно инкубировали с блокирующими антителами к PD-1 (20 мкг/мл, ОПДИВО (ниволумаб), США) и TIM-3 (10 мкг/мл, Ultra-LEAF Purified anti-human Tim-3, BioLegend, США)) в течение 1 часа, и далее оценивали продукцию внутриклеточных цитокинов по методике, как описано выше.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., USA). На графиках данные представлены в виде медиан с указанием интерквартильных диапазонов и минимума–максимума, если не указано иное. Значимость различий сравниваемых групп оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок; различия считали значимыми при $p_w < 0,05$.

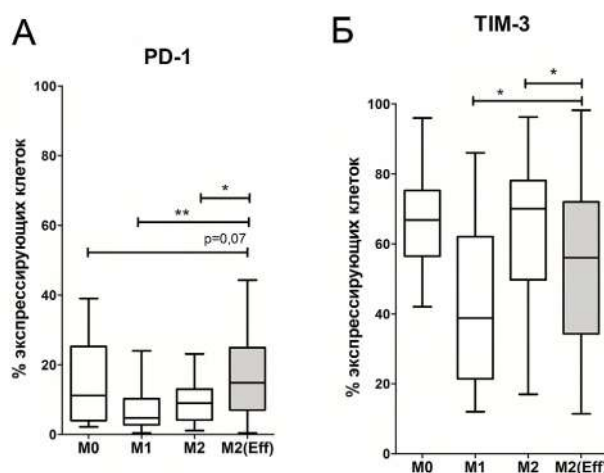
РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия чек-поинт рецепторов. Для сравнения с M2(Eff) были использованы GM-CSF-дифференцированные макрофаги, неполяризованные (M0)

и поляризованные в направлении M1 (липополисахарид) и M2 (IL-4) (что соответствует фенотипу M2a, часто используемому в научной литературе). Оценка экспрессии PD-1 и TIM-3 на поверхности макрофагов показала, что M2(Eff) значительно отличались как от неполяризованных клеток, так и от поляризованных M1 и, что интересно, «классических» M2 (рис. 1). Культуры M2(Eff) характеризовались более высоким содержанием PD-1⁺ клеток по сравнению с поляризованными M1 и M2 макрофагами ($p_w = 0,006$ и $0,028$ соответственно). В свою очередь, доля TIM-3⁺ клеток в культурах M2(Eff) значительно превышала показатели в M1 ($p_w = 0,044$), однако была ниже, чем у клеток с «классическим» M2 фенотипом ($p_w = 0,031$).

Дальнейший анализ распределения маркеров (рис. 2) показал, что более высокое содержание PD-1⁺ в M2(Eff) по сравнению с M1 культурами было обусловлено преимущественно клетками с сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3, в то время как различия с M2 культурами наблюдались в основном за счет клеток с изолированной экспрессией PD-1. При этом доля клеток с изолированной экспрессией TIM-3 в M2(Eff) культурах была значительно ниже по сравнению с неполяризованными M0 и M2.

Таким образом, M2(Eff) отличались от других исследованных субпопуляций макрофагов сравнительно более высоким уровнем экспрессии ко-ингибиторных молекул и особенно PD-1, а также обладали уникальным профилем коэкспрессии маркеров. Далее мы провели анализ внутриклеточной продукции цитокинов IL-10 и TNF- α в популяции M2(Eff) в зависимости от экспрессии ингибиторных рецепторов.



Примечания: $n = 14-26$, ** – $p_w < 0,01$; * – $p_w < 0,05$.

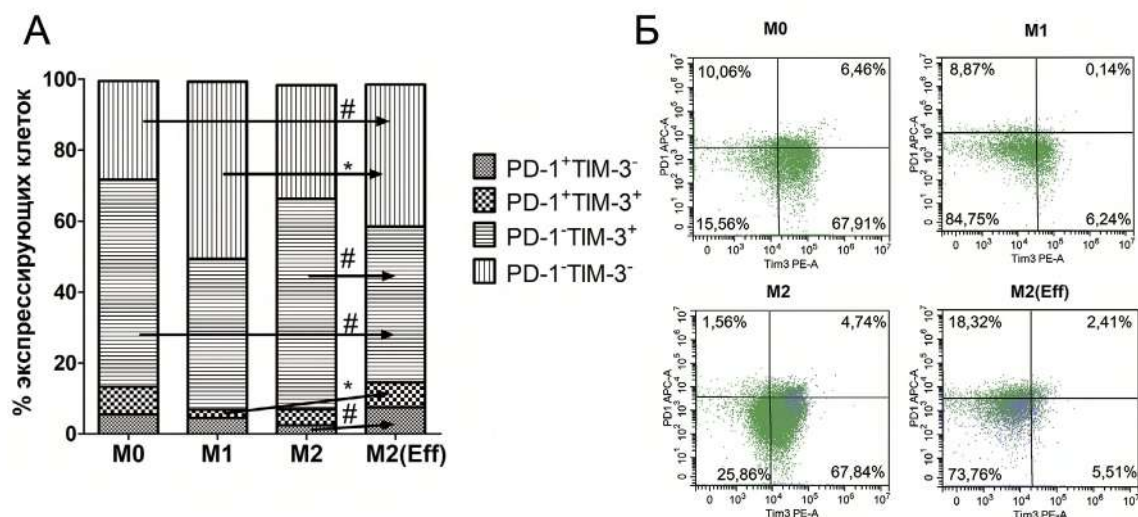
Notes: $n = 14-26$, ** – $p_w < 0,01$; * – $p_w < 0,05$.

РИС. 1.

Содержание клеток (в %), оппозитных по экспрессии PD-1 (А) и TIM-3 (Б) в культурах макрофагов M0, M1, M2 и M2(Eff)

FIG. 1.

Proportion of cells (%) with opposing expression of PD-1 (A) and TIM-3 (B) in M0, M1, M2, and M2(Eff) macrophage cultures



Примечания: А – данные представлены в виде медианных значений для каждой из популяций (PD-1⁺TIM-3⁻, PD-1⁺TIM-3⁺, PD-1⁻TIM-3⁺, PD-1⁻TIM-3⁻) ($n = 14-26$). Стрелками обозначены различия между подтипами макрофагов, * – $p_w < 0,05$, # – $p_w < 0,1$ (тренд). Б – данные проточной цитометрии (репрезентативный эксперимент).

Notes: A – data are presented as medians calculated for each population (PD-1⁺TIM-3⁻, PD-1⁺TIM-3⁺, PD-1⁻TIM-3⁺, PD-1⁻TIM-3⁻) ($n = 14-26$). Arrows indicate differences between macrophage subtypes. * – $p_w < 0,05$, # – $p_w < 0,1$ (trend). B – flow cytometry data (representative experiment).

РИС. 2.

Распределение экспрессии PD-1 и TIM-3 в макрофагах M0, M1, M2, M2(Eff)

FIG. 2.

Co-expression and single expression of PD-1 and TIM-3 in M0, M1, M2, and M2 (Eff) macrophages

Продукция цитокинов. Как показано на рис. 3А, в нестимулированных культурах доля IL-10-продуцирующих клеток была значимо выше в популяции PD-1⁺ по сравнению с популяцией PD-1⁻ ($p_w = 0,0037$), тогда как различий между популяциями TIM-3⁺ и TIM-3⁻ не наблюдалось (рис. 3Б и 3Ж). Напротив, при оценке продукции TNF- α зависимости от экспрессии PD-1 выявлено не было (рис. 3Е), тогда как TIM-3⁺ клетки характеризовались значимо более высокой секрецией TNF- α по сравнению с TIM-3⁻ ($p_w = 0,029$) (рис. 3Д, 3Е и 3Ж). При этом анализ отдельных субпопуляций свидетельствовал о том, что более высокое содержание IL-10 в PD-1⁺ клетках осуществлялась как за счет клеток с сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3, так и за счет изолированной экспрессии PD-1 (рис. 3В). Интересно, что клетки с изолированной экспрессией TIM-3 также отличались более высоким уровнем продукции IL-10 по сравнению с клетками с дабл-негативной экспрессией чек-поинт молекул (PD-1⁻TIM-3⁻), поэтому отсутствие различий между TIM-3⁺ и TIM-3⁻ клетками могут быть обусловлены высокой долей IL-10-продуцирующих клеток в популяции PD-1⁺TIM-3⁻ (рис. 3В).

В LPS стимулированных культурах сохранялись различия в доле IL-10⁺ клеток в популяциях, оппозитных по экспрессии PD-1, а также появлялись значимые различия для TIM-3⁺ и TIM-3⁻ клеток ($p_w = 0,012$) (рис. 4). При этом наиболее выраженная продукция IL-10 была характерна для клеток, экспрессирующих оба маркера, и она значимо отличалась от клеток с изолированной экспрессией PD-1 ($p_w = 0,012$) и изолированной экспрессией TIM-3 ($p_w = 0,021$). В свою очередь, экспрессия TNF- α для LPS-стимулированных M2(Eff) не была

ассоциирована с экспрессией PD-1 или TIM-3 (рис. 4Г и 4Д).

Блокирование PD-1 и TIM-3 путей. Для оценки функциональной значимости чек-поинт сигналинга, мы провели серию экспериментов с блокирующими антителами к TIM-3 и PD-1. Блокирование PD-1 на этапе стимуляции цитокин-секреторной активности LPS сопровождалось усилением продукции IL-10, которое, однако, не достигало статистической значимости ($p_w = 0,686$) (рис. 5А). В то же время добавление блокирующих антител к PD-1 вызывало небольшое (2 %), но достоверное повышение уровня секреции TNF- α (рис. 5Б) ($p_w = 0,043$). Учитывая, что доля PD-1⁺ клеток в культурах M2(Eff) составляла 15 % (7–25 %), данный прирост, регистрируемый в общей популяции M2(Eff), может отражать существенный вклад PD-1/PD-L1 пути в регуляцию продукции данного цитокина. Интересно, что блокирование TIM-3 не сопровождалось подобным эффектом.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленном исследовании мы впервые охарактеризовали профиль экспрессии чек-поинт рецепторов PD-1 и TIM-3 на M2(Eff) макрофагах, индуцированных взаимодействием с апоптотическими клетками, а также установили связь между экспрессией данных маркеров и цитокин-продуцирующей функцией макрофагов.

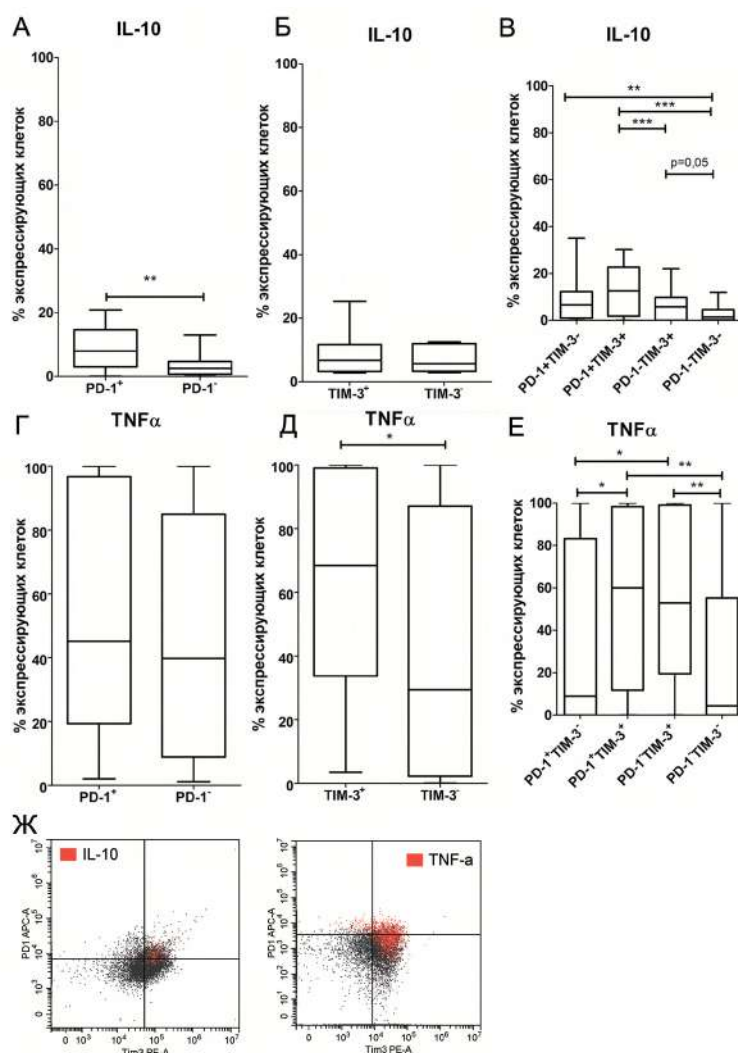
Мы обнаружили, что M2(Eff) макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии PD-1

относительно M1 и M2 культур. Учитывая установленную связь экспрессии PD-1 с противовоспалительной активностью клеток [7, 13], это может являться одним из путей, обеспечивающих противовоспалительную и иммунорегуляторную функцию M2(Eff), которая была описана нами ранее [14].

Интересно, что по уровню TIM-3 M2(Eff) занимала промежуточное положение: его экспрессия была выше, чем у M1, но ниже, чем у «классических» M2, индуцированных IL-4. Эти данные в целом согласуются с исследованиями прошлых лет, продемонстрировавшими более высокий уровень экспрессии TIM-3 на макрофагах с M2 фенотипом по сравнению с M1 клетками [15]. С другой стороны, это было довольно неожиданное открытие, поскольку мы предполагали, что TIM-3,

который ассоциирован с фагоцитозом [16, 17], будет наиболее высоким именно в M2(Eff) культурах, поляризирующим фактором для которых является взаимодействие с апоптотическими клетками. Вероятно, в данный процесс больше вовлечены иные пути, такие как тирозинкиназа Mer или TIM-4, которые также являются важными молекулами, опосредующими фагоцитоз в макрофагах [18].

TIM-3 широко известен как регулятор иммунных ответов и его экспрессия на макрофагах ассоциирована с противовоспалительным фенотипом и поддержанием тканевого гомеостаза [19]. С другой стороны, TIM-3 может проводить и активирующие сигналы [20], что позволяет исследователям рассматривать его не просто как ко-ингибиторный рецептор, а скорее



Примечания: А, Б, В – содержание IL-10⁺ в M2(Eff), оппозиционных по экспрессии PD-1, TIM-3 и в клетках с изолированной и сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3. Г, Д, Е – содержание TNF-α⁺ в M2(Eff), оппозиционных по экспрессии PD-1, TIM-3 и в клетках с изолированной и сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3. n = 14–26, *** – $p_w < 0,001$; ** – $p_w < 0,01$; * – $p_w < 0,05$. Ж – данные проточной цитометрии (репрезентативный эксперимент).

Notes: А, Б, В – content of IL-10⁺ in M2(Eff), opposite in expression of PD-1, TIM-3 and in cells with isolated and co-expression of PD-1 and TIM-3. Г, Д, Е – content of TNF-α⁺ in M2(Eff), opposite in expression of PD-1, TIM-3 and in cells with isolated and co-expression of PD-1 and TIM-3. n = 14–26, *** – $p_w < 0,001$; ** – $p_w < 0,01$; * – $p_w < 0,05$. Ж – Flow cytometry data (representative experiment).

РИС. 3.
Содержание IL-10⁺ и TNF-α⁺ клеток (в %) в популяциях M2(Eff) макрофагов

FIG. 3.
Proportion of IL-10⁺ and TNF-α⁺ cells (%) in M2(Eff) macrophage populations

как «контрольный механизм», регулирующий сложный баланс иммунной системы. Более низкий уровень TIM-3 на M2(Eff) по сравнению с «классическими» M2, может отражать функциональные различия между этими двумя типами M2-подобных макрофагов.

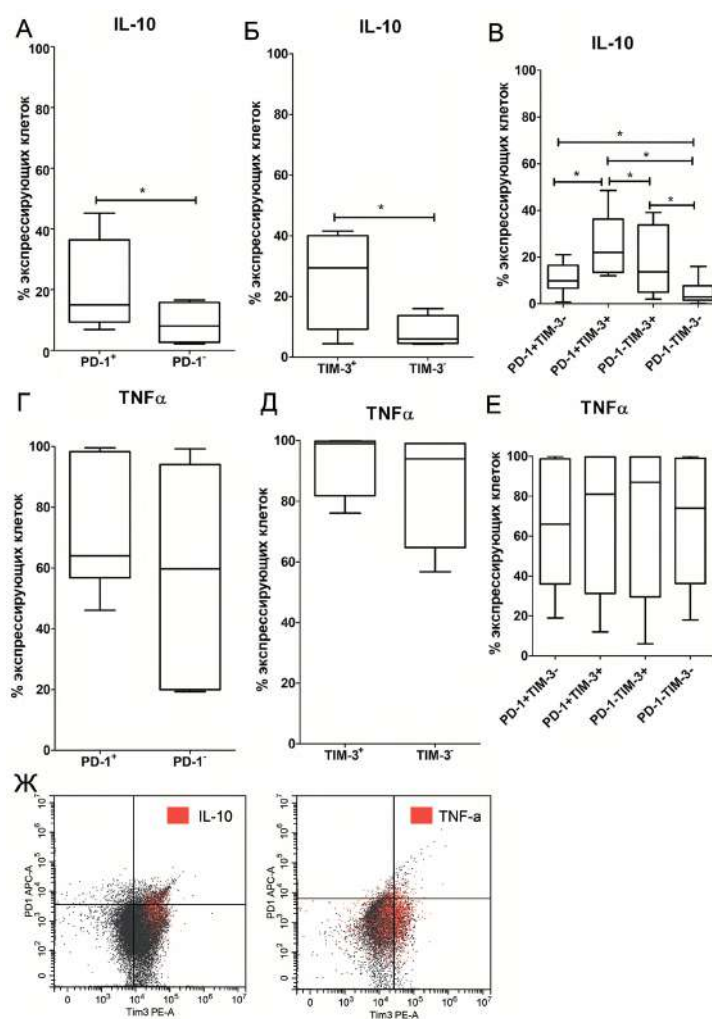
Дополнительно нами были обнаружены различия в коэкспрессии маркеров, что позволяет предположить, что M2(Eff) занимают особое положение в спектре макрофагальной поляризации, сочетая черты, присущие как «классическим» M2, так и иным регуляторным фенотипам.

Анализ внутриклеточной продукции цитокинов выявил функциональную асимметрию между PD-1 и TIM-3 в макрофагах M2(Eff). PD-1⁺ клетки отличались более высоким уровнем продукции IL-10, но не TNF-α, тогда

как TIM-3⁺ клетки, напротив, характеризовались повышенной продукцией TNF-α, но не отличались от TIM-3⁻ по продукции IL-10.

Ассоциация PD-1 с продукцией IL-10 согласуется с данными о том, что PD-1/PD-L1 путь в миелоидных клетках может способствовать формированию противовоспалительного фенотипа. Так, ранее было показано, что активация PD-1 индуцирует продукцию IL-10 моноцитами [21]. Полученные нами данные указывают на сопряженность экспрессии PD-1 и продукции IL-10 M2(Eff) макрофагами.

В то же время связь TIM-3 с продукцией TNF-α представляется менее ожидаемой, учитывая преимущественно супрессорную роль данной молекулы [19]. Однако ряд исследований указывает на то, что TIM-3



Примечания: А, Б, В – Содержание IL-10⁺ в M2(Eff), оппозитных по экспрессии PD-1, TIM-3 и в клетках с изолированной и сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3. Г, Д, Е – Содержание TNF-α⁺ в M2(Eff), оппозитных по экспрессии PD-1, TIM-3 и в клетках с изолированной и сочетанной экспрессией PD-1 и TIM-3. n=8; * – $p_w < 0,05$. Ж – данные проточной цитометрии (репрезентативный эксперимент).

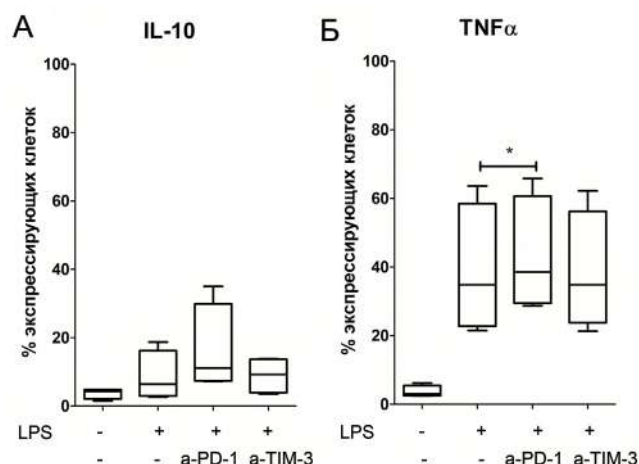
Notes: A, B, C – content of IL-10⁺ in M2(Eff), opposite in expression of PD-1, TIM-3 and in cells with isolated and co-expression of PD-1 and TIM-3. G, D, E – content of TNF-α⁺ in M2(Eff), opposite in expression of PD-1, TIM-3 and in cells with isolated and co-expression of PD-1 and TIM-3. n=8; * – $p_w < 0,05$. Z – flow cytometry data (representative experiment).

РИС. 4.

Содержание IL-10⁺ и TNF-α⁺ клеток (в %) в популяциях LPS-стимулированных M2(Eff) макрофагов

FIG. 4.

Proportion of IL-10⁺ and TNF-α⁺ cells (%) in populations of LPS-stimulated M2(Eff) macrophages



Примечания: $n = 5$; * – $p_w < 0,05$.

Notes: $n = 5$; * – $p_w < 0.05$.

РИС. 5.

Содержание IL-10+ (А) и TNF-α+ (Б) клеток (в %), в культурах M2(Eff) макрофагов, стимулированных/нестимулированных липополисахаридом (LPS) и обработанных блокирующими антителами к PD-1 (a-PD-1) и TIM-3 (a-TIM-3)

FIG. 5.

Proportion of IL-10+ (A) and TNF-α+ (B) cells (%) in M2(Eff) macrophage cultures stimulated/unstimulated with lipopolysaccharide (LPS) and treated with blocking antibodies against PD-1 (a-PD-1) and TIM-3 (a-TIM-3)

может выполнять контекст-зависимые функции. Так, в моноцитах TIM-3 участвует в регуляции баланса между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами [5]. Возможно, в макрофагах M2(Eff) TIM-3 действует не как классический ингибиторный рецептор, а как молекула, модулирующая внутриклеточные сигнальные пути, ведущие к продукции TNF-α. Не исключен также некоторый механизм обратной связи, то есть, компенсаторно, более высокий уровень экспрессии регуляторной молекулы TIM-3 на клетках с усиленной продукцией TNF-α.

После стимуляции LPS менялось содержание цитокинов в популяции TIM-3⁺ клеток: доля IL-10⁺ была значимо выше по сравнению с TIM-3⁺ клетками, а различия по TNF-α между TIM-3⁺ и TIM-3⁻, обнаруживаемые для не стимулированных клеток, нивелировались. Данная зависимость согласуется с ранее полученными данными, согласно которым активация TIM-3-сигналинга стимулировала моноциты к секреции IL-6, IL-8 и IL-10, но не IL-1β, IL-12p70 или TNF-α в присутствии LPS [22].

Наиболее важные результаты были получены в исследовании блокирования чек-поинт рецепторов. Блокирование PD-1 приводило к небольшому, но устойчивому повышению продукции TNF-α во всей популяции M2(Eff), что еще раз подчеркивает роль PD-1 как маркера противовоспалительного фенотипа клеток, активация которого ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов в миелоидных клетках, в том числе продукцию TNF-α через подавление STAT1 сигналинга

[23]. В то же время, блокирование TIM-3 не приводило к изменению продукции TNF-α, что согласуется с результатами исследования Zhang Y. et al., продемонстрировавших подобную зависимость на моноцитах [5].

Отсутствие снижения IL-10 при блокировании PD-1 и TIM-3 указывает на то, что данные пути не являются критическими для индукции IL-10 в M2(Eff) в условиях LPS-стимуляции. Вероятно, продукция IL-10 в данных клетках контролируется иными механизмами, например, через рецепторы, распознающие апоптотические клетки, такие как тирозинкиназа Mer [24]. Этот вопрос остается предметом дальнейших исследований. Кроме того, необходима оценка иных цитокинов, продуцируемых макрофагами, для однозначных выводов о какой-либо зависимости PD-1 и TIM-3 и цитокиновым профилем M2(Eff). Функциональные исследования помогут понять, насколько значимую роль играет PD-1 и TIM-3 сигналинг в противовоспалительной и репаративной активности макрофагов M2(Eff).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, макрофаги M2(Eff), индуцированные апоптотическими клетками, характеризуются уникальным профилем экспрессии PD-1 и TIM-3, и эти молекулы ассоциированы с продукцией цитокинов IL-10 и TNF-α. Полученные данные расширяют представления о роли иммунных контрольных точек в регуляции функций миелоидных клеток, а также указывают на необходимость дальнейшего исследования данных путей в функциональной активности M2(Eff) макрофагов и открывают перспективы для поиска новых механизмов противовоспалительной и репаративной активности данных клеток.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках плановой темы НИР ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Минобрнауки России FGMN-2024-0011 (per. № 124112900022-0).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rezazadeh-Gavgani E, Majidazar R, Lotfinejad P, Kazemi T, Shamekh A. Immune Checkpoint Molecules: A Review on Pathways and Immunotherapy Implications. *Immun Inflamm Dis*. 2025; 13(4): e70196. doi: 10.1002/iid3.70196
2. Chen S, Chen J, Kong Y, Li H, Chen Z, Luo L, et al. Knockdown of TIM3 Hampers Dendritic Cell Maturation and Induces Immune Suppression by Modulating T-Cell Responses. *Int J Mol Sci*. 2025; 26(9): 4332. doi: 10.3390/ijms26094332

3. de Mingo Pulido Á, Hänggi K, Celias DP, Gardner A, Li J, Batista-Bittencourt B, et al. The inhibitory receptor TIM-3 limits activation of the cGAS-STING pathway in intra-tumoral dendritic cells by suppressing extracellular DNA uptake. *Immunity*. 2021; 54(6): 1154–1167.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2021.04.019
4. Lim TS, Chew V, Sieow JL, Goh S, Yeong JP, Soon AL, et al. PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8+ T cell function and antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2015; 5(3): e1085146. doi: 10.1080/2162402X.2015.1085146
5. Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Moorman JP, et al. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2012; 91(2): 189–96. doi: 10.1189/jlb.1010591
6. Dong J, Cheng L, Zhao M, Pan X, Feng Z, Wang D. Tim-3-expressing macrophages are functionally suppressed and expanded in oral squamous cell carcinoma due to virus-induced Gal-9 expression. *Tumour Biol*. 2017; 39(5): 1010428317701651. doi: 10.1177/1010428317701651
7. Li W, Wu F, Zhao S, Shi P, Wang S, Cui D. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: A key player in tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2022; 67: 49–57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2022.07.004
8. Jiang H, Pang J, Li T, Akofala A, Zhou X, Yi C, et al. PD-1 regulates the anti-tumor immune function of macrophages through JAK2-STAT3 signaling pathway in colorectal cancer tumor microenvironment. *J Transl Med*. 2025; 23(1): 502. doi: 10.1186/s12967-025-06469-4
9. Wang F, Zhou F, Peng J, Chen H, Xie J, Liu C, et al. Macrophage Tim-3 maintains intestinal homeostasis in DSS-induced colitis by suppressing neutrophil necroptosis. *Redox Biol*. 2024; 70: 103072. doi: 10.1016/j.redox.2024.103072
10. Isshiki T, Akiba H, Nakayama M, Harada N, Okumura K, Homma S, et al. Cutting Edge: Anti-TIM-3 Treatment Exacerbates Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice. *J Immunol*. 2017; 199(11): 3733–3737. doi: 10.4049/jimmunol.1700059
11. Hou N, Jiang N, Zou Y, Piao X, Liu S, Li S, et al. Down-Regulation of Tim-3 in Monocytes and Macrophages in Plasmodium Infection and Its Association with Parasite Clearance. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1431. doi: 10.3389/fmicb.2017.01431
12. Шевела Е.Я., Дегтярева В.Г., Сосновская А.В., Воронова Е.В., Кафанова М.Ю., Ращупкин И.М., и др. Корректирующий эффект растворимых факторов макрофагов М2-фенотипа у детей с нарушением речи. *Медицинская иммунология*. 2021; 23(5): 1137–1150. [Shevela EYa, Degtyareva VG, Sosnovskaya AV, Voronova EV, Kafanova MYu, Rashchupkin IM, et al. Therapeutic effect of soluble factors of M2 phenotype macrophages in children with language impairments. *Medical Immunology (Russia)*. 2021; 23(5): 1137–1150. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-TEO-2224
13. Han Z, Wu X, Qin H, Yuan YC, Schmolze D, Su C, et al. Reprogramming of PD-1+ M2-like tumor-associated macrophages with anti-PD-L1 and lenalidomide in cutaneous T cell lymphoma. *JCI Insight*. 2023; 8(13): e163518. doi: 10.1172/jci.insight.163518
14. Sakhno LV, Shevela EY, Tikhonova MA, Ostanin AA, Chernykh ER. The Phenotypic and Functional Features of Human M2 Macrophages Generated Under Low Serum Conditions. *Scand J Immunol*. 2016; 83(2): 151–9. doi: 10.1111/sji.12401
15. Ocaña-Guzman R, Ramon-Luing LA, Vazquez-Bolaños LA, Rodríguez-Alvarado M, Bulhosen-Rodriguez F, Torres-Hatem A, et al. Tim-3 Is Differentially Expressed during Cell Activation and Interacts with the LSP-1 Protein in Human Macrophages. *J Immunol Res*. 2023; 2023: 3577334. doi: 10.1155/2023/3577334
16. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*. 2009; 113(16): 3821–30. doi: 10.1182/blood-2008-10-185884
17. Zhao D, Guo M, Liu B, Lin Q, Xie T, Zhang Q, et al. Frontline Science: Tim-3-mediated dysfunctional engulfment of apoptotic cells in SLE. *J Leukoc Biol*. 2017; 102(6): 1313–1322. doi: 10.1189/jlb.3HI0117-005RR
18. Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(8): 1512–20. doi: 10.1128/MCB.01394-13
19. Ocaña-Guzman R, Torre-Bouscoulet L, Sada-Ovalle I. TIM-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. *Front Immunol*. 2016; 7: 229. doi: 10.3389/fimmu.2016.00229
20. Yu A, Zhang X, Li M, Ye P, Duan H, Zhang T, et al. Tim-3 enhances brain inflammation by promoting M1 macrophage polarization following intracerebral hemorrhage in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017; 53: 143–148. doi: 10.1016/j.intimp.2017.10.023
21. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. 2010; 16(4): 452–9. doi: 10.1038/nm.2106
22. Wang Z, Yin N, Zhang Z, Zhang Y, Zhang G, Chen W. Upregulation of T-cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3 (Tim-3) in Monocytes/Macrophages Associates with Gastric Cancer Progression. *Immunol Invest*. 2017; 46(2): 134–148. doi: 10.1080/08820139.2016.1229790
23. Roy S, Gupta AK, Banerjee M, Das PK, Ukil A. PD-1 negatively tunes macrophage immune activation by turning off JNK and STAT1 signaling: Exploited by Leishmania for its intra-macrophage survival. *Cell Immunol*. 2023; 391–392: 104758. doi: 10.1016/j.cellimm.2023.104758
24. Ubil E, Zahid KR. Structure and functions of Mer, an innate immune checkpoint. *Front Immunol*. 2023; 14: 1244170. doi: 10.3389/fimmu.2023.1244170

Сведения об авторах

Макимова Александра Александровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: parkinson.dses@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0884-0226>

Тыринова Тамара Викторовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: tyrinova@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7987-2017>

Сахно Людмила Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: lsahno53@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3290-7910>

Тихонова Марина Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: martix-59@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2366-1667>

Шевела Екатерина Яковлевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: shevelak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8997-3586>

Останин Александр Анатольевич – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: ostanin62@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6895-938X>

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; e-mail: ct_lab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2346-6279>

Information about the authors

Aleksandra A. Maksimova – Cand. Sc. (Med.), researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: parkinson.dses@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0884-0226>

Tamara V. Tyrinova – Dr. Sc. (Biol.), lead researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: tyrinova@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7987-2017>

Ludmila V. Sakhno – Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: lsahno53@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3290-7910>

Marina A. Tikhonova – Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: martix-59@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2366-1667>

Ekaterina Ya. Shevela – Dr. Sc. (Med.), lead researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: shevelak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8997-3586>

Aleksandr A. Ostanin – Dr. Sc. (Med.), chief researcher at the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: ostanin62@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6895-938X>

Elena R. Chernykh – Dr. Sc. (Med.), head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy in the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; e-mail: ct_lab@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2346-6279>

Статья опубликована в рамках VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ», 22–24 июня 2026 г.