Polarizacija makrofaga u zdravlju i bolesti

Horvat, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:981871

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

POLARIZACIJA MAKROFAGA U ZDRAVLJU I BOLESTI

MACROPHAGE POLARIZATION IN HEALTH AND DISEASE

SEMINARSKI RAD

Marina Horvat

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 3
2. M1 I M2 MAKROFAGI ... 4
3. MAKROFAGI I TUMORI ... 4
3.1. Kronična upala ... 6
3.2. Imunosupresija ... 6
3.3. Angiogeneza ... 6
3.4. Metastaze ... 7
3.5. Makrofagi kao cilj borbe protiv tumora ... 7
4. MAKROFAGI I HIV-1 ... 8
4.1. $M1_{hiv}$ ... 9
4.2. Repolarizacija makrofaga ... 10
4.3. Liječenje AIDS-a-a ... 11
5. MAKROFAGI I PRETILOST ... 11
5.1. ATM – *adipose tissue macrophages* ... 12
5.2. Dijabetes tipa II ... 13
5.3. Makrofagi kao cilj borbe protiv bolesti uzrokovanih pretilošću ... 14
6. MAKROFAGI I ATEROSKLEROZA ... 14
6.1. Makrofagi u plaku ... 15
6.2. Remodeliranje plaka ... 16
6.3. Liječenje ateroskleroze ... 16
7. ZAKLJUČAK ... 17
8. LITERATURA ... 19
9. SAŽETAK ... 22
10. SUMMARY ... 22

1. UVOD

Svakodnevno smo izloženi milijunima potencijalnih patogena, putem kontakta, gutanja i udisanja. Ipak, većina nas još uvijek može normalno funkcionirati i živjeti bez neprestane bolesti. Za to je zaslužan naš kompleksni imunosni sustav, koji mehanizmima urođene/opće i adaptivne/specijalizirane obrane održava naš organizam zdravim.

Urođeni imunosni sustav prožima svako tkivo ljudskog tijela i predstavlja prvu liniju obrane. Stanice urođene imunosti – monociti-makrofagi i urođenoubilačke stanice (NK, od engl. *natural killer cells*) izazivaju brze i nespecifične odgovore na signale opasnosti te predstavljaju antigene stanicama adaptivnog imunosnog sustava (Biswas i sur. 2012).

Monociti, progenitori većine makrofaga tkiva, predstavljaju 10 do 30% svih cirkulirajućih mononuklearnih leukocita (Najafi i sur. 2019). Nastavši iz mijeloidnog progenitora u koštanoj srži, monociti krvotokom dolaze do tkiva i organa, gdje prelaze u makrofage. Osnovna biološka uloga makrofaga jest fagocitoza, čime uklanjaju patogene mikroorganizme i druge strane tvari. Sudjeluju i u održanju homeostaze tkiva, na način da stvaraju i izlučuju biološki aktivne čimbenike, kojima djeluju na okoliš (Biswas i sur. 2012).

Važna komponenta imunosnog sustava je polarizacija, čime imunosne stanice poprimaju različite funkcionalne programe. Među stanicama hematopoetskog porijekla, stanice monocitno-makrofagne loze su vjerojatno najplastičnije (Shapouri- Moghaddam 2018). Djelovanjem različitih okolišnih stimulansa na njihove membranske receptore, aktiviraju se različiti unutarstanični signalni putovi, što dovodi do aktivacije određenih gena. To pak dovodi do promjena u funkcionalnim svojstvima makrofaga, kao što su stanična adhezija i migracija, proizvodnja citokina/kemokina te obrada antigena (Najafi i sur. 2019).

Međutim, polarizacija makrofaga podupire različite, u nekim slučajevima čak i suprotne biološke funkcije. U ovom seminaru prikazane su uloge makrofaga u razvoju tumora, upalnih bolesti poput dijabetesa i ateroskleroze te infekcije virusom HIV-a te mogući načini njihove upotrebe u svrhu liječenja.

2. M1 I M2 MAKROFAGI

Tijekom 1990-ih godina otkriveno je da citokinski interleukin (IL)-4 izaziva različite učinke na ekspresiju gena makrofaga, u usporedbi s onom interferona (IFN)-γ i bakterijskog lipopolisaharida (LPS). Za razliku od "klasične aktivacije" makrofaga s IFN-γ, ekspresija inducirana s IL-4 opisana je kao "alternativna aktivacija". Danas prevladava klasifikacija makrofaga u kojoj su "klasično" i "alternativno" aktivirani makrofagi označeni kao "M1" i "M2", analogno Th1/Th2 podjeli $CD4^+$ limfocita T (Shapouri- Moghaddam 2018).

M1 makrofagi su inducirani bakterijskim spojevima (LPS) ili upalnim citokinima (IFN-γ, čimbenik tumorske nekroze-α (TNF-α, od engl. *tumour necrosis factor*). Također su i izvor upalnih citokina (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23), čime imaju sposobnost povećati i održati stalni upalni odgovor. Druga ključna funkcija M1 makrofaga je aktivacija nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfatnog (NADPH) oksidaznog sustava i inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS). Na temelju toga, M1 makrofagi se općenito smatraju moćnim efektorskim stanicama, koje ubijaju mikroorganizme i tumorske stanice (Josephs 2015). Međutim, kontinuirana indukcija M1 makrofaga uzrokovat će oštećenje tkiva i smanjiti zacjeljivanje rana. Da bi se to spriječilo, kronični upalni odgovor inhibiran je regulatornim mehanizmima potaknutim protuupalnom funkcijom M2 makrofaga.

Citokini IL-4 i IL-13 putem aktiviranja transkripcijskog čimbenika STAT6 (od engl. *signal transducer and activator of transcription 6*) i IL-10 preko aktiviranja STAT3, kao i drugi Th2 citokini i glukokortikoidni hormoni, induciraju M2 polarizaciju tkivnih makrofaga (Alfano 2013). Njih karakterizira loša proizvodnja dušikovog oksida (NO) te upalnih citokina te povećana proizvodnja arginaze-1 i protuupalnih citokina, kao što je transformirajući čimbenik rasta-β (TGF-β, od engl. *transforming growth factor* β), antagonist IL-1 receptora (IL-1RA, od engl. *interleukin-1 receptor antagonist*), IL-10, i imaju povećano izlučivanje kolagena. Uz protuupalno djelovanje, promiču angiogenezu, remodeliranje i popravak tkiva (Josephs 2015).

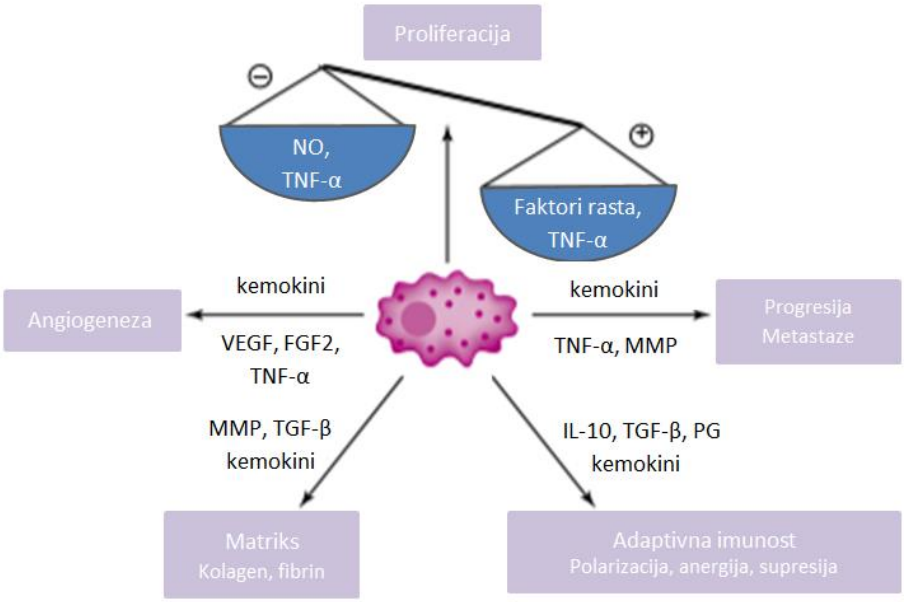
3. MAKROFAGI I TUMORI

Tumori su kompleksna tkiva sastavljena od dva odvojena, ali međuovisna dijela: malignih stanica i strome. Stromu čini mnogo raznovrsnih elemenata, podijeljenih u tri skupine: nove krvne žile, vezivno tkivo i upalne stanice (Dvorak 1986). Stanice urođenog

imunosnog sustava su visoko zastupljene u tom složenom ekosustavu, a makrofagi predstavljaju glavninu njih. Prvi ih je put u ljudskim tumorima uočio Virchow 1863. godine, a mogu činiti čak do 50% mase tumora (Poh i Ernst 2018) te se nazivaju tumoru pridruženi makrofagi (TAM, od engl. *tumour associated macrophages*).

Prva je pretpostavka bila da su TAM uključeni u antitumorski imunosni odgovor, no klinički i eksperimentalni podatci pokazali su upravo suprotno - u većini slučajeva TAM promiču progresiju tumora. To je potkrijepljeno meta-analizom koja pokazuje korelaciju između brojnosti tumorskih makrofaga i loše prognoze bolesnika, u više od 80% slučajeva (Josephs i sur. 2015).

M1 tip makrofaga predstavlja upalni fenotip s antitumorskom aktivnošću, dok je M2 imunosupresivni tip stanica koji doprinosi progresiji tumora. U ranom stadiju tumorigeneze, rezidentni M1 makrofagi unutar tumorskog mikrookruženja su dio prvog odgovora. Međutim, sami nastanak tumorskih stanica može se prvo pojaviti zbog genetskih mutacija uzrokovanih vrstama NO i TNF iz upravo M1 makrofaga (Josephs i sur. 2015). Međutim, fiziološke promjene koje prate razvitak tumora, kao što su hipoksija, promjena razine glukoze i pH mogu rezultirati fenotipskim prebacivanjem na "trofički" fenotip sličan M2, koji mehanizmima promicanja kronične upale, imunosupresije, angiogeneze i invazije/metastaze promiču razvitak tumora (Poh i Ernst 2018) (Slika 1).



Slika 1. Pojednostavljen prikaz uloge TAM-a u imunobiologiji tumora.
Preuzeto i prilagođeno iz Mantovani i Locati. 2013.

3.1. KRONIČNA UPALA

Dva signalna puta povezuju upalu i rak. U intrinzičnom putu, aktivacija različitih klasa onkogena pokreće programe upale, koje vode konstrukciji upalnog mikrookruženja. U vanjskom putu, upalna stanja potiču razvoj tumora. Ključni čimbenici organizacije oba puta su transkripcijski čimbenici (npr. NF-κB - nuklearni faktor-κB), citokini i kemokini (Mantovani 2011). O aktivaciji NF-κB ovisi ekspresija proupalnih citokina (IL-12, IL-1β, IL-6, TNF-α), a s obzirom da TAM pokazuju defektivnu aktivaciju NF-κB, njihova ekspresija je na niskoj razini. Stoga, u smislu citotoksičnosti i ekspresiji proupalnih citokina, TAM se ponašaju kao M2 (Sica i sur. 2005).

3.2. IMUNOSUPRESIJA

TAM pokazuju supresivni učinak na adaptivni imunosni odgovor domaćina. Proizvodeći citokine i kemokine, negativno moduliraju ishod potencijalnog antitumorskog odgovora. IL-10, IL-6, krvožilni endotelni čimbenik rasta (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*) i TGF-β inhibiraju sazrijevanje i aktivaciju dendritičnih stanica (Sica i sur. 2005). Specifičnije, IL-10 povećava ekspresiju programiranog liganda smrti-1 (PD-L1, od engl. *programmed death-ligand 1*) na površini monocita i TAM-a, s čijim se povezivanjem inhibiraju aktivirane efektorske T-stanice (Poh i Ernst 2018). Njihovu supresiju potiču i T-regulatorne stanice (Treg). Njih, kao i Th2 stanice, privlače TAM-proizvedeni kemokini (CCL2, CCL17, CCL18 i CCL22). Uz poticanje diferencijacije monocita prema M2 fenotipu, njihov boravak u mikrookruženju kojim dominiraju M2 makrofagi i nezrele dendritičke stanice, naposlijetku izaziva anergiju, tj. nesposobnost imunosne reakcije zbog nemogućnosti stvaranja specifičnih protutijela (Mantovani i Locati 2013).

3.3. ANGIOGENEZA

Benigni-maligni prijelaz većine tumora obilježen je značajnim povećanjem formiranja krvnih žila, poznatim kao "angiogeni prekidač". Angiogeneza je još jedna uloga M2 makrofaga - njihova povećana infiltracija tumora izravno korelira s gustoćom krvnih žila u njima (Poh i Ernst 2018).

Hipoksija je glavni pokretač angiogeneze, održavana pomoću čimbenika hipoksije-1α (HIF-1α, od engl. *hypoxia-inducible factor 1-α*) i HIF-2α, koji su pod konstitutivnom ekspresijom u TAM-u kao rezultat djelovanja inhibitora diferencijacije (ID4), kojeg izlučuju stanice tumora (Najafi i sur. 2019). Ove promjene koreliraju s povećanom ekspresijom kemokina CXCR4 (od engl. *C-X-C chemokine receptor type 4*), CCL2 (od engl. *C-C motif chemokine ligand 2*) i endotelina, koji pojačavaju novačenje makrofaga u tumore. Što ima više TAM-a, izlučuju se veće količine čimbenika rasta TGF-β, PDGF (od engl. *platelet-derived growth factor*) i VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*) te fibrina, koji zajedno potiču sazrijevanje krvnih žila i vaskularnu permeabilnost.

3.4. METASTAZE

Metastaze su glavni uzrok smrti prilikom pojave tumora. Javljaju se kada se tumorske stanice odvajaju i šire na distalne organe. Makrofagi su dominantne stanice na mjestu razaranja bazalne membrane tijekom rane tumorigeneze i na invazivnoj fronti tumora tijekom maligne transformacije te su tako dobili naziv makrofagi povezani s metastazama (MAM, od engl. *metastasis-associated macrophages*). Njihovo novačenje potiče pojačana ekspresija CSF1 (od engl. *colony stimulating factor 1*) od strane tumorskih stanica, a zadržavanje u metastatskim žarištima se autokrino potiče putem MAM-proizvedog CCL3 (Poh i Ernst 2018).

Kao bogat izvor proteaza, uključujući katepsine, matriks metaloproteinaze (MMP) i serinske proteaze, MAM potiču razgradnju izvanstaničnog matriksa. Na taj način se omogućava prolazak tumorskih stanica kroz gustu stromu, a lučenjem epidermalnog čimbenika rasta (EGF, od engl. *epidermal growth factor*) potiče se njihova migracija i odlazak u susjedne organe (Poh i Ernst 2018).

3.5. MAKROFAGI KAO CILJ BORBE PROTIV TUMORA

Imunoterapija pomoću makrofaga u liječenju tumora ima cilj spriječiti TAM da usvoji M2 fenotip ili promicati repolarizaciju makrofaga prema tumoricidnom M1 fenotipu.

IFN-α inducira visoku ekspresiju M1-povezanih biljega, kao što su MHC II (od engl. *major histocompatibility complex II*) i CD86 (od engl. *cluster of differentiation 86*) u TAM-u, uzrokujući smanjenje rasta tumora i prekid metastaziranja, što ukazuje na njegovo antitumorsko djelovanje (Poh i Ernst 2018). Zolendronična kiselina inhibira migraciju makrofaga te proliferaciju i sekreciju čimbenika koji potiču aktivnost tumora, kao što su matriks metaloproteinaze te, kao i anti-IL10 i anti-IL10 receptor, mijenja polarizaciju prema M1. Osim toga, glikoprotein plazme bogat histidinima (HRG, od engl. *histidine-rich glycoprotein*), s efektom anti-angiogeneze, također inducira M1 polarizaciju smanjenjem ekspresije placentnog čimbenika rasta (PGF, od engl. *placental growth factor*) (Alfano 2013).

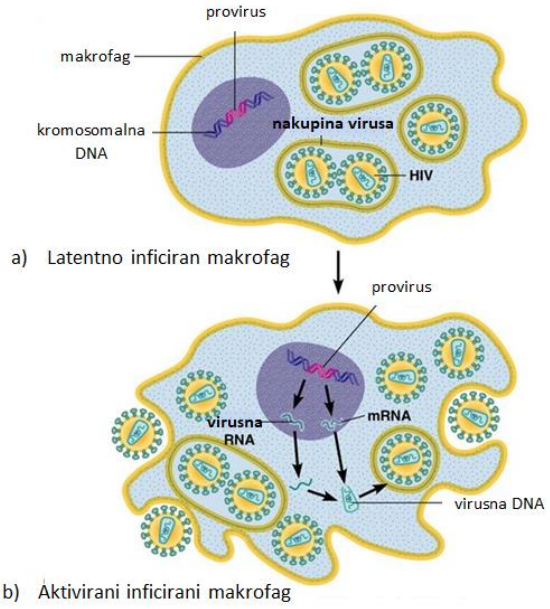
4. MAKROFAGI I HIV-1

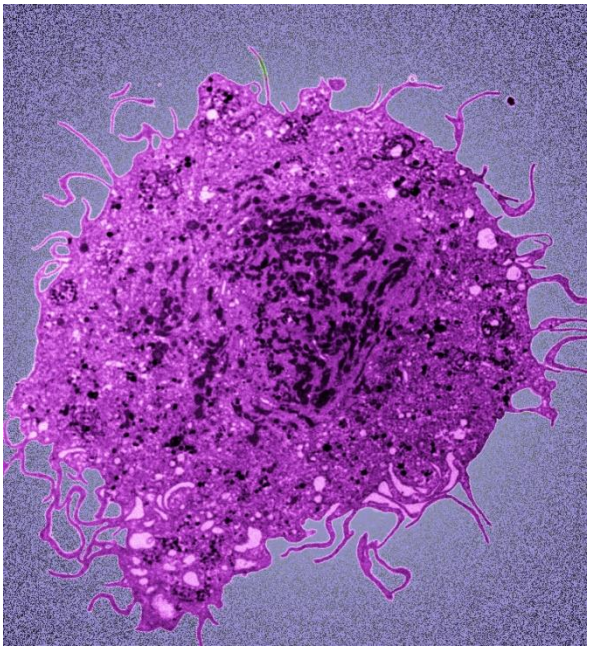
Patogeni su razvili vješte strategije zaobilaženja imunosnog odgovora domaćina. Glavna među tim strategijama je sprječavanje odgovora na podražaj ili napad na protuupalni mehanizam, kako bi se zaštitila cjelovitost tkiva. Manipulacija polarizacijom makrofaga jedna je od glavnih meta za postizanje toga, budući da makrofagi predstavljaju prvu liniju aktivnog obrambenog sustava u domaćinu, a ukoliko je ona uspješna, može potkopati i urođenu i adaptivnu imunost (Lugo-Villarino 2011).

HIV-1 (od engl. *human immunodeficiency virus-1*) je patogeni humani retrovirus iz roda *Lentivirus*. Glavno obilježje patogenosti mu je snažno narušavanje imunosnog sustava domaćina, uzrokujući stanje kronične imunosne aktivacije koja na kraju dovodi do progresivnog teškog imunosnog nedostatka s osiromašenjem $CD4^+$ pomoćničkih T-stanica. To stanje naziva se sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS, od engl. *acquired immune deficiency syndrome*) (Alfano i sur. 2013), te nastupa nakon 2 do 15 godina od primarne infekcije, kada period kliničke latencije završi i pojavljuju se oportunističke infekcije.

Pokazano je da je samo nekoliko monocita iz periferne krvi zaraženo s HIV-1 virusom. Međutim, druga istraživanja pokazala su da HIV-1 može izravno zaraziti progenitorske stanice u koštanoj srži. Unatoč tom paradoksu, nakon migracije u periferna tkiva, ti makrofagi su kronično inficirani i imaju temeljnu ulogu kao virusni spremnici tijekom svih stadija bolesti, promičući imunosnu disregulaciju i širenje virusa. Konkretno, tkivni makrofagi su izvrsni čimbenici za uspostavljanje virusnih ležišta jer su sveprisutni, imaju dugi poluživot, relativno su neosjetljivi na citopatske učinke replikacije virusa (za

razliku od $CD4^+$ T-limfocita) te imaju specifičnu sposobnost proizvodnje i pohranjivanja zrelih viriona HIV-a u unutarstaničnim odjeljcima još neutvrđenog podrijetla (Alfano i sur. 2013) (Slika 2). Zaista, makrofagi zaraženi HIV-om su populacija stanica ključna za razvitak daljnje infekcije, uključujući njihovo širenje u druge organe, poput mozga, koji predstavlja ciljni organ infekcije (Herbein i Varin 2010).





Slika 2. Infekcija makrofaga s HIV. Preuzeto i prilagođeno iz McQueen i Porter. 2016 i Burdo i sur. 2015.

4.1. $M1_{HIV}$

In vitro, makrofagi tijekom akutne HIV-1 infekcije predstavljaju M1 fenotip. Međutim, za razliku od M1 dobivenih polarizacijom lipopolisaharidima, takozvani "$M1_{HIV}$" se ne polariziraju putem receptora sličnih Tollu (TLR, od engl. *toll-like receptors*) i ne proizvode TNF, IL-1-β ili IL-6 proupalne citokine. Umjesto toga, jako reagiraju na TLR agoniste poput lipopolisaharida CL097 (agonist TLR 7/8) i poliinozinske:policitidilne kiseline (Alfano i sur. 2013) što dovodi do čak pet puta jače proizvodnje citokina (Cassol 2010). Osim toga, virusni gen *Nef* uzrokuje pojačano izlučivanje M1 kemokina - CCL3, CCL4 i CCL5 (ligandi CC-kemokina receptora 5 (CCR5) - glavni receptor za ulazak HIV-1), i smanjeno

izlučivanje M2 biljega, kao što su CD163, receptor za manozu CD206, CCL18 i IL-10 (Alfano i sur. 2013).

$M1_{HIV}$ makrofagi pokazuju reduciranu fagocitnu sposobnost i defektnu sposobnost migracije, što je povezano sa smanjivanjem broja kemotaktičkih liganada (CD88 i bakterijski tripeptid fMLP=N-formyl-met-leu-phe). Ti funkcionalni nedostaci, pak, rezultiraju neučinkovitom kontrolom oportunističkih patogena i daljnje poboljšanje aktivacije i patogeneze bolesti. Osim toga, makrofagi zaraženi HIV-om su uključeni u eliminaciju efektornih $CD8^+$ T-stanica putem međureakcija između TNF vezanog na površini makrofaga i njegovog receptora TNFR2 na T-stanicama (Cassol 2010).

Ovi rezultati podupiru hipotezu da induciranjem M1-fenotipa tijekom akutne infekcije doprinosi, između ostaloga, uspostavljanju i održavanju stanja kronične aktivacije koja se danas smatra glavnom odrednicom progresije bolesti tijekom HIV-1 infekcije (Alfano i sur. 2013).

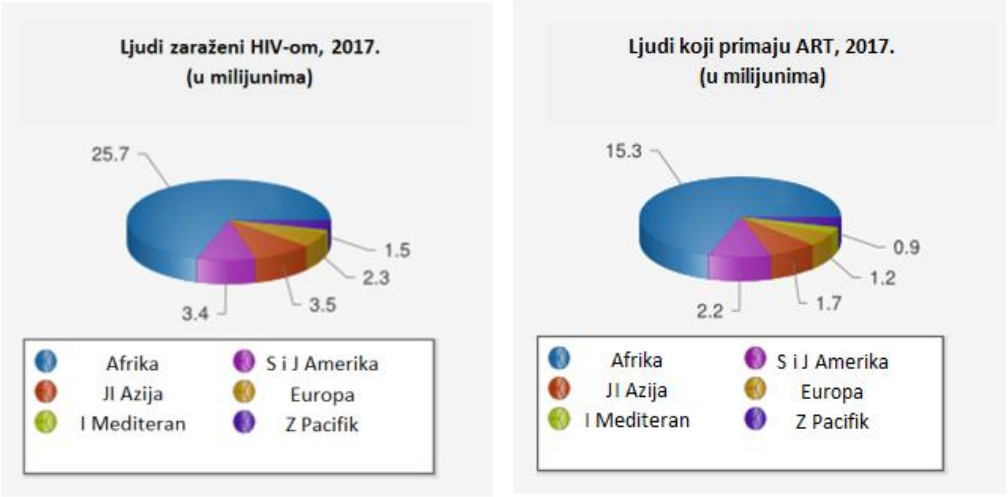
4.2. REPOLARIZACIJA MAKROFAGA

Kako HIV napreduje od akutnog do asimptomatskog stanja, postoji trenutak u kojemu M1 makrofagi prelaze u M2 tip. *In vitro* aktivacija M2 makrofaga obrađenih s IL-4 rezultira u inhibiciji replikacije virusa. Ostala istraživanja su pokazala kako IL-4 i IL-13 smanjuju reverznu transkriciju virusa. Reverznu transkripciju snažno inhibiraju i M2 makrofagi obrađeni s IL-10, kao i transkripciju njegovog dugog ponavljajućeg slijeda (LTR, od engl. *long terminal repeat*) i njegovo sastavljanje (Lugo-Villarino 2011).

Stoga, prijelaz na M2 fenotip može se smatrati kao dio obrambenog mehanizma domaćina pri kontroliranju oštećenja tkiva uzrokovano M1 makrofagima. Međutim, prijelaz na M2 može se također pripisati i strategiji opstanka HIV-a zbog povećanja prisutnosti PD-L1 i ekspresije PD-L2 i PD-1, koji imaju važnu ulogu tijekom iscrpljenosti limfocita T za vrijeme infekcije (Lugo-Villarino 2011). To dovodi do imunosnog zatajenja u vrlo kasnim stadijima bolesti i ubrzanim iscrpljivanjem i $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocita što konačno vodi do njihove apoptoze. U svakom slučaju, praćenjem polarizacije makrofaga može se pratiti tijek bolesti (Herbein i Varin 2010).

4.3. LIJEČENJE AIDS-a

Od otkrića da je HIV uzrok AIDS-a i utvrđivanja da je to glavni uzrok smrti povezan sa zaraznim bolestima, 2017. godine procjenjeno je da je 36,9 milijuna ljudi širom svijeta živjelo sa tim virusom u svojim makrofagima (Slika 3). Tijekom posljednja tri desetljeća došlo je do velikog napretka u razumijevanju životnog ciklusa i patogeneze virusa. Kao rezultat toga, razvijeni su antiretrovirusni lijekova koje je primalo čak 59% oboljelih (Slika 3). Konkretno, kombinirana visoko aktivna anti-retrovirusna terapija (HAART, od engl. *highly active antiretroviral therapy*) rezultirala je smanjenjem smrtnosti i povećanjem kvalitete života (Galvão-Lima, 2017). Međutim, latencija virusa i ustrajnost virusnih ležišta su danas još uvijek glavne prepreke u iskorijenjivanju infekcije ovim virusom (Cassol 2010).



Slika 3. Grafički prikaz broja ljudi zaraženih HIV-om i onih koji se liječe anti-retrovirusnom terapijom, po regijama svijeta za 2017. godinu. Preuzeto i prilagođeno iz https://www.who.int/hiv/data/en/.

5. MAKROFAGI I PRETILOST

Pretilost je nutritivni poremećaj koji je posljedica kronične neravnoteže između unosa energije i njezine potrošnje. Uzrokuje ili pogoršava mnoge zdravstvene probleme, kako samostalno tako i zajedno s drugim bolestima. Posebice, pretilost je povezana s koronarnim bolestima srca, određenim oblicima tumora, poremećajima disanja i dijabetesom tipa II (Ren i sur. 2019).

Najnoviji podaci sugeriraju da pretilost može predstavljati stanje kronične upale niskog stupnja povezano s infiltracijom upalnih stanica u masno tkivo. Iako populacije makrofaga borave u gotovo svim tjelesnim tkivima, njihov povećani broj zabilježen je u upravo u bijelom masnom tkivu (WAT, od engl. *white adipose tissue*) te se nazivaju makrofagi adipoznog tkiva (ATM, od engl. *adipose tissue macrophage*). I kod ljudi i kod glodavaca, sa sve većom tjelesnom težinom, povećava se i količina ATM-a, a njihova količina korelira sa stupnjem inzulinske rezistencije. Ima ih više u visceralnom nego potkožnom masnom tkivu, što je u sukladu s hipotezom da visceralna masnoća igra istaknutiju ulogu u rezistenciji na inzulin. Štoviše, gubitak težine dovodi do smanjenja i upalnih biljega i biljega ATM-a (Lumeng 2007).

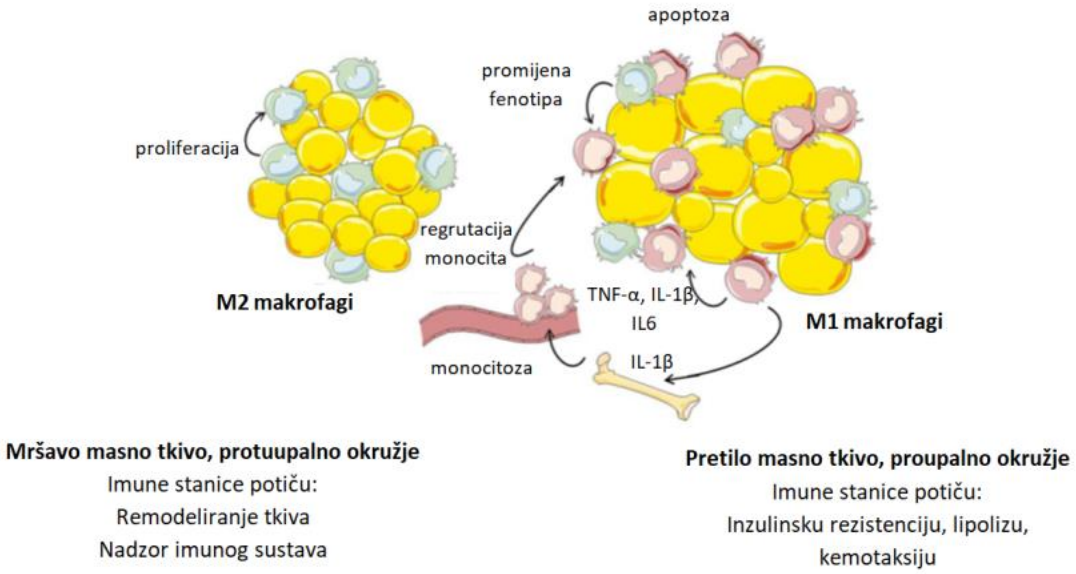
Kasnije je pokazano da akumulacija makrofaga u pretilosti nije ograničena na WAT, nego i na druge organe kritične za homeostazu glukoze, poput jetre, gušterače, crijeva, čak i mozga. Međutim, iako se u masnom tkivo odlaže samo mali udio glukoze u tijelu, imunosna disfunkcija unutar tog tkiva je dovoljna da naruši sustavni metabolizam glukoze (Kraakman 2014).

5.1. ATM – makrofagi adipoznog tkiva (engl. *adipose tissue macrophages*)

U bijelom masnom tkivu mršavih miševa, makrofagi, unovačeni od $CCR2^-$ monocita, čine do 10% rezistentnih stanica te imaju M2 fenotip. Poticanjem popravka tkiva i angiogeneze u masnom tkivu, oni pomažu u održavanju normalne adipocitne funkcije. Višak hranjivih tvari dovodi do ekspanzije adipocita, s povećanim izlučivanjem kemoatraktanata $CCR2^+$ krvnih monocita u WAT (Ren i sur. 2019). Luče se TNF-α, slobodne masne kiseline te, od kemokina, proizvode se monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1) i njegov receptor, CCR2, CCL7, leukotrien (LTB4) i inhibitor migracije (MIF, od engl. *migration inhibitory factor*). Izlučuju se i drugi čimbenici koji utječu na matične stanice koštane srži prilikom čega se povećava stupanj mijelopoeze, što dodatno povećava priljev makrofaga u masno tkivo (Kraakman 2014). Većina unovačenih monocita je putem tih upalnih signala diferencirana u M1 makrofage te čine čak do 50% svih stanica u bijelom masnom tkivu debelih miševa (Slika 4).

M2 makrofagi mogu djelomično spriječiti aktivaciju i akumulaciju M1 makrofaga, i sekrecijom IL-10 pomoći u zaštiti adipocita od štetnih učinaka TNF-α i srodnih citokina.

Međutim, s povećanjem adipoznosti, M1-polarizirani makrofagi dobivaju dominantnu ulogu te proizvode NO i visoke količine proupalnih citokina kao što su TNF-α, IL-1β i IL-6. Zanimljivo je što pokazuju različite obrasce ekspresije za proteine površine stanice (npr. CD38, CD319, i CD274) i aktiviranje staničnih signalnih putova (npr. NF-kB), što nije obilježje fenotipa M1 (Ren i sur. 2019).



Slika 4. Modulacija makrofaga u masnim stanicama tijekom pretilosti.
Preuzeto i prilagođeno iz Kraakman 2014.

5.2. DIJABETES TIPA II

Među dijabetičarima, 95% bolesnika ima dijabetes tipa II, čije β-stanice gušterače proizvode inzulin, ali su mišićne, jetrene i masne stanice neosjetljive na njega, čime se narušava metabolizam glukoze u organizmu. Pretpostavlja se da ATM imaju važnu ulogu u tom metaboličkom poremećaju. Citokini TNF-α, IL-1β i IL-6 spriječavaju pozitivno djelovanje adiponektina i leptina na inzulin (Ren i sur. 2019). Takvo štetno djelovanje pro-upalnih citokina može ublažiti IL-10 - kod ljudi, razine cirkulirajućeg IL-10 koreliraju s biljezima poboljšane inzulinske osjetljivosti (Lumeng 2007).

Proizvodnja kemokina i proteaza također potiče nakupljanje drugih upalnih stanica, kao i apoptozu, angiogenezu i remodeliranje proteina matriksa. M1 makrofagi su također

povezani s komplikacijama dijabetesa, kao što su nefropatija, neuropatija, retinopatija i kardiovaskularne bolesti (Ren i sur. 2019).

5.3. MAKROFAGI KAO CILJ BORBE PROTIV BOLESTI UZROKOVANIH PRETILOŠĆU

Pretilost je sada toliko uobičajena u svjetskoj populaciji da počinje zamjenjivati pothranjenost i zarazne bolesti kao najznačajniji čimbenik lošeg zdravlja. Diabetes tipa II, kao moguća posljedica pretilosti, dostiže razmjere epidemije, pri čemu je jedno od jedanaestero odraslih ljudi pogođeno tom bolešću (Kopelman 2010).

S obzirom na negativne učinke ATM-a u uspostavi i progresiji bolesti, jedan tip liječenja bazira se na njihovom uklanjanju (Cucak 2014). Klondrat u liposomima je toksični spoj kojeg uzimaju makrofagi, čime se inducira njihova apoptoza. Time se uspije smanjiti akumulacija ATM-a i poboljšati metabolizam glukoze i osjetljivost na inzulin u miševa. Međutim, ovaj pristup ima ograničenja jer liposomi klodronata ciljaju sve fenotipove makrofaga pa i Kuppferove stanice u jetri (Kraakman 2014).

S druge strane, s obzirom da M2 fenotip pokazuje pozitivne učinke u pretilosti i dijabetesu tipa II, postoje i liječenja kojima je cilj postići polarizaciju ATM prema M2. Primjeri takvih liječenja uključuju upotrebu glutamina, kao najčešće aminokiseline u plazmi mnogih sisavaca, preko glutamin UDP-N-acetilglukozamin puta (Ren i sur. 2019), te pomoću IL-10, kao protuupalnog citokina (Lumeng. 2007). Na taj način ne dolazi do uništavanja makrofaga, što može ugroziti imunosno stanje pacijenta. Međutim, povećana funkcija M2 makrofaga također je čvrsto povezana s proliferacijom tumora, spomenutim ranije u ovome radu, tako da se manipuliranje M2 populacijama mora pažljivo promatrati zbog povećane učestalosti formiranje tumora (Kraakman 2014).

6. MAKROFAGI I ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je bolest kod koje dolazi do lokalnih zadebljanja stijenke arterija - ateroma ili plakova. Započinje oštećenjem endotela – unutrašnjosti krvne žile, većinom zbog povećane količine kolesterolom bogatih LDL čestica (od engl. *low density lipoproteins*) u krvi, koje se potom nakupljaju na stijenci.

Napredna faza ateroskleroze rezultat je kompleksnog imunosnog i upalnog odgovora organizma. Kronična upala rezultat je stalnog priljeva makrofaga u plak, koji pretstavljaju glavnu populaciju leukocita aterosklerotske lezije (Mantovani. 2009). Ove lipoproteine fagocitiraju tkivni makrofagi, čime se u njima nakuplja kolesterol i postaju „pjenaste stanice“ (od engl. *foam cells*). Stalni poticaj ulaska i zadržavanja LDL čestica ne potiču samo nakupljanje pjenastih stanica u plak (Slika 5), nego i dugotrajnost i pojačavanje upalnog odgovora, što pridonosi fragilnosti plaka čime oni pucaju i uzrokuju akutnu ishemiju tkiva, tj. lokalni prekid dotoka krvi (Slika 5). Stoga makrofagi zauzimaju središnju ulogu u patofiziologiji ateroskleroze, u njenom razvoju, progresiji i puknuću ateroma te je njihova diferencijacija priznata kao ključna za nastanak ateroskleroze (Lee i sur. 2018).

6.1. MAKROFAGI U PLAKU

Iako je broj i M1 i M2 makrofaga povećan tijekom ljudske progresije plaka, M1 fenotip makrofaga je dominantan u područjima plaka podložna rupturi, dok su M2 biljezi dominantni u stabilnijim plakovima, daleko od lipidne jegre (Peled i Fisher 2014).

Snažan induktor stanja M1 *in vitro* je LPS, dio vanjske membrane Gram-negativnih bakterija, koji se veže za makrofage i aktivira TLR4. Kao posljedica promjene u crijevnoj mikroflori, do povećanja razine LPS u krvi, a time i sklonosti nastanku plaka, dovode prehrana proizvodima velike masnoće, što dovodi do metaboličkog sindroma (inzulinska rezistencija, nakupljanje masnog tkiva u području trbuha, visoka razina kolesterola i povišen krvni tlak). Do polarizacije M1 makrofaga dovode i protein visoke mobilnosti grupe 1 (HMG1, od engl. *high-mobility group protein 1*) i IFN-γ, kao i aktivacija inflamasoma. Djelovanjem oksidiranih fosfolipida i oksidiranog LDL-a inhibira se migracija makrofaga, čime se produžava upalni odgovor koji izazivaju.

Makrofagi M1 također izlučuju kemokine (kao što je MCP-1) i citokini (kao što je IL-12) koji induciraju kemotaksiju drugih bijelih krvnih stanica. Lučenjem MMP2 i MMP9, koji mogu razgraditi izvanstanični matriks u plaku, dolazi do destabilizacije i puknuća plaka. M1 makrofagi aktiviraju druge makrofage, kao i ostale tipove stanica u ateromu (stanice endotela i glatkih mišića). Ljudski M2 *in vitro* sadrže male kapljice lipida, što je povezano sa smanjenom sposobnošću izlučivanja kolesterola. U mišjim makrofagima, kada su stanice polarizirane na M1 stanje, došlo je do smanjenja regulacije CERP-a (od engl. *cholesterol*

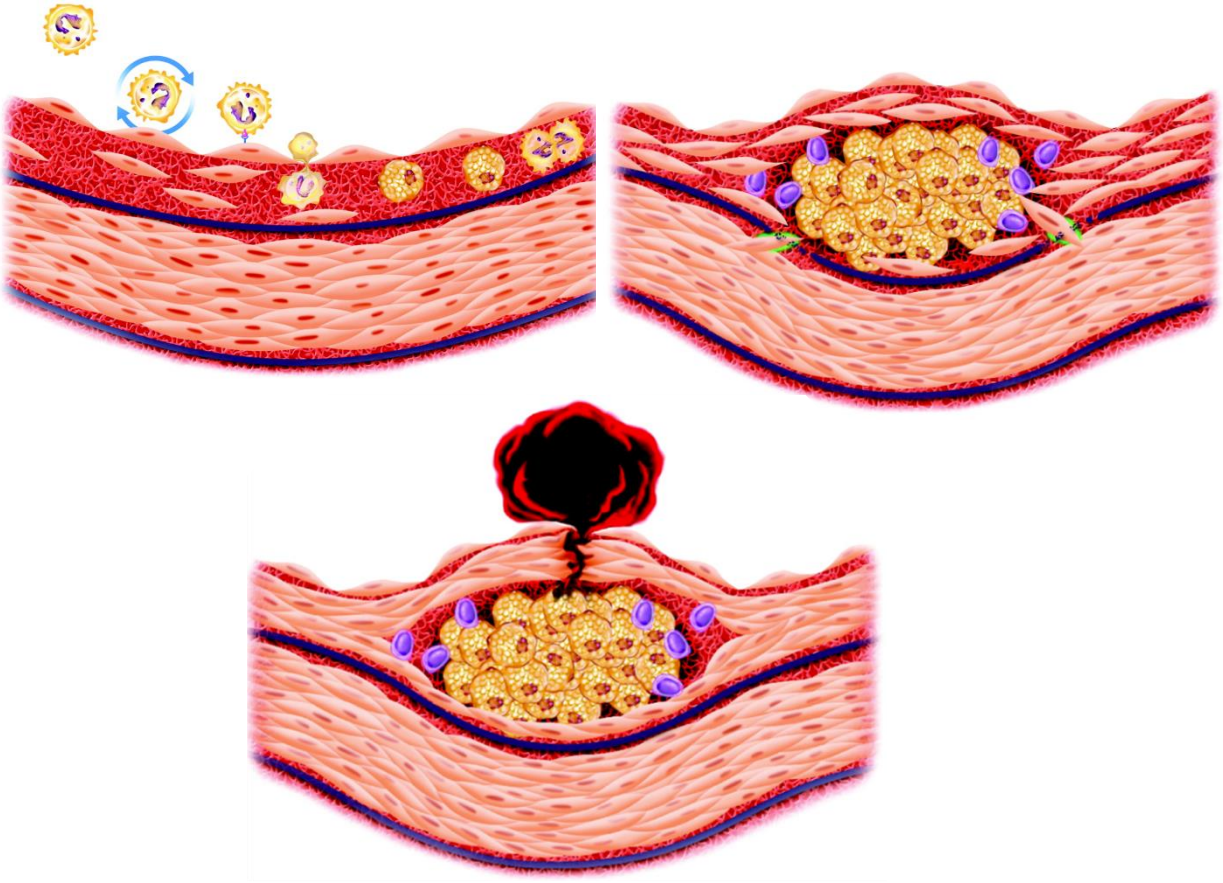
efflux regulatory protein) te time smanjenja istjecanja kolesterola. *In vivo*, to dovodi do začaranog kruga - akumulacijom kolesterola dovodi do aktivacije i polarizacije M1 makrofaga, koja inducira nakupljanje kolesterola (Peled i Fisher 2014).

6.2. REMODELIRANJE PLAKA

Promicanje smanjenja razine upale pomoću M2 makrofaga u regresijskim plakovima je vjerojatno posljedica njihovog izlučivanja citokina IL-10. Remodeliranje plaka može biti posljedica barem dva druga svojstva M2 makrofaga - izlučivanja kolagena i povećane sposobnost za eferocitozu – uklanjanje apoptotskih stanica. Tijekom progresije ateroskleroze, sposobnost pohranjivanja kolesterola u makrofagima se smanjuje, a akumulira se slobodni kolesterol, uzrokujući stres i apoptozu. Ukoliko se ne uklanjanju apoptotične stanice, dolazi do njihovog akumuliranja i stvaranja nekrotične jezgre, čime se dalje širi plak. Stoga, obogaćivanjem plaka M2 makrofagima očekuje se da će njihova pojačana eferocitozna aktivnost očistiti apoptotične stanice i time zaustaviti, pa čak i preokrenuti, nekrotičnu ekspanziju jezgre (Peled i Fisher 2014).

6.3. LIJEČENJE ATEROSKLEROZE

Dijagnoze kao što su akutni infarkt miokarda, ishemijska bolest srca i moždani udar već godinama zauzimaju prva mjesta među uzrocima smrtnosti u svijetu, ali i u Hrvatskoj. Glavni je cilj u borbi protiv bolesti srca i krvnih žila spriječiti da uopće nastane aterosklerotička nakupina, što se postiže suzbijanjem i liječenjem čimbenika rizika. Pri tome se osim povećanog ukupnog i LDL kolesterola u krvi, pažnja posvećuje i povećanim udjelom triglicerida, a smanjenim udjelom zaštitnog HDL kolesterola u krvi (Reiner 2012). Aktivno smanjenje LDL-a provodi se pomoću lipidom-modificirajuće terapije (npr. statina), međutim, postojeće strategije liječenja ne mogu spriječiti stvaranje koronarnih bolesti u 75% slučajeva (Hoeksema 2012).



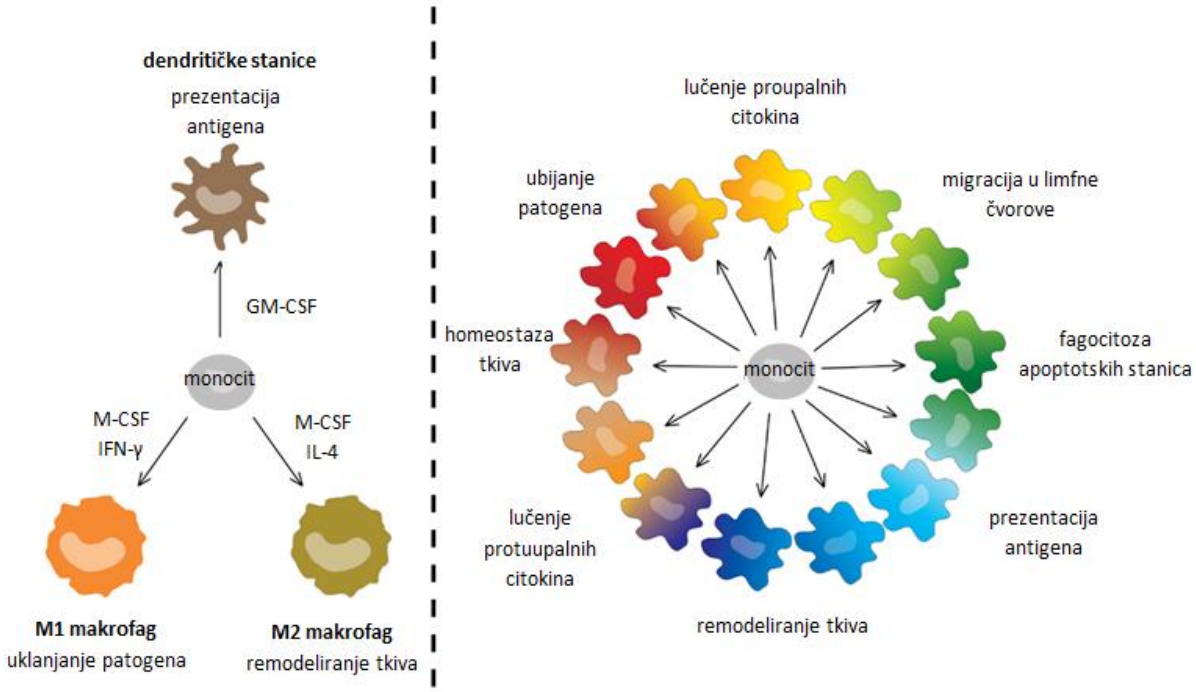
Slika 5. Inicijacija i progresija ateroskleroze te puknuće plaka, Preuzeto i prilagođeno iz Packard i Libby2008.

7. ZAKLJUČAK

Polarizacija makrofaga je dinamički proces upravljan raznim mehanizmima, koji određuju njihovu raspodjelu među tkivima i funkcionalne kapacitete kao odgovor na endogene i egzogene signale. Promjene u funkciji makrofaga i polarizaciji povezane su s raznim ljudskim bolestima. Pretjerane ili produljene M1 reakcije su uključene u razvoj upalnih bolesti (ateroskleroza) i metaboličkih bolesti (pretilost, dijabetes) te tijekom ranih

faza virusne infekcije (AIDS), dok tijekom kasne faze glavnu ulogu imaju M2 makrofagi, kao i u tumorigenezi.

Međutim, iako je M1/M2 klasifikacija makrofaga dala korisne uvide u ulogu i funkciju mijeloidnih stanica u zdravlju i bolesti, podjela makrofaga na dva ekstrema ne predstavlja u potpunosti kontinuum funkcionalnih stanja koje oni mogu izraziti (Slika 6).



Slika 6. M1/M2 model klasifikacije makrofaga u usporedbi sa „kontinuiranim“ modelom. Preuzeto i prilagođeno iz Guilliams i van de Laar. 2015.

8. LITERATURA

Alfano M, Graziano F, Genovese L, Poli G, 2013. Macrophage polarization at the crossroad between HIV-1 infection and cancer development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **33**(6), 1145-1152.

Biswas S K, Chittezhath M, Shalova I N, Lim J Y, 2012. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*, **53**(1-3), 11-24.

Burdo T H, Walker J, Williams K C, 2015. Macrophage polarization in AIDS: dynamic interface between anti-viral and anti-inflammatory macrophages during acute and chronic infection. *Journal of clinical & cellular immunology*, **6**(3), 333.

Cassetta L, Cassol E, Poli G, 2011. Macrophage polarization in health and disease. *The Scientific World Journal*, **11**, 2391-2402.

Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G, 2010. Macrophage polarization and HIV- 1 infection. *Journal of leukocyte biology*, **87**(4), 599-608.

Cucak H, Grunnet L G, Rosendahl A, 2014. Accumulation of M1- like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology*, **95**(1), 149-160.

Dvorak H F, 1986. Tumors: wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*, **315**(26), 1650-1659.

Galvão-Lima L J, Espíndola M S, Soares L S, Zambuzi F A, Cacemiro M, Fontanari C, Frantz F G, 2017. Classical and alternative macrophages have impaired function during acute and chronic HIV-1 infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **21**(1), 42-50.

Guilliams M, van de Laar L, 2015. A Hitchhiker's guide to myeloid cell subsets: practical implementation of a novel mononuclear phagocyte classification system. *Frontiers in immunology*, **6**, 406.

Herbein G, Varin A, 2010. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation?. *Retrovirology*, **7**(1), 33.

Hoeksema M A, Stöger J L, de Winther M P, 2012. Molecular pathways regulating macrophage polarization: implications for atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, **14**(3), 254-263.

Josephs D H, Bax H J, Karagiannis S N, 2015. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy. *Front Biosci (Elite Ed)*, **7**, 293-308.

Kopelman P G, 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, **404**(6778), 635.

Kraakman M J, Murphy A J, Jandeleit-Dahm K, Kammoun H L, 2014. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function?. *Frontiers in immunology*, **5**, 470.

Lee S G, Oh J, Bong S K, Kim J S, Park S, Kim S, Jang Y, 2018. Macrophage polarization and acceleration of atherosclerotic plaques in a swine model. *PloS one*, **13**(3), e0193005.

Lugo-Villarino G, Vérollet C, Maridonneau-Parini I, Neyrolles O, 2011. Macrophage polarization: convergence point targeted by Mycobacterium tuberculosis and HIV. *Frontiers in immunology*, **2**, 43.

Lumeng C N, Bodzin J L, Saltiel A R, 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, **117**(1), 175-184.

Mantovani A, Locati M, 2013. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **33**(7), 1478-1483.

Mantovani A, Garlanda C, Locati M, 2009. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **29**(10), 1419-1423.

Mantovani A, 2011. Tumor-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Immunotherapy*, **3**(4s), 21-22.

McQueen, N, Porter Z, 2016. *Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases*, prezentacija s kolegija Microbiology and Infectious Diseases Sveučilišta u južnoj Dakoti. Preuzeto sa https://slideplayer.com/slide/8219064/

Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei M S, Khanlarkhani N, Kashani I R, 2019. Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of cellular biochemistry*, **120**(3), 2756-2765.

Peled M, Fisher E A, 2014. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Frontiers in immunology*, **5**, 579.

Poh A R, Ernst M, 2018. Targeting macrophages in cancer: from bench to bedside. *Frontiers in oncology*, **8**, 49.

Reiner Ž, 2012. Ateroskleroza–bolest od koje umire svaki drugi Hrvat. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, 169-174.

Ren W, Xia Y, Chen S, Wu G, Bazer F W, Zhou B, Yin Y, 2019. Glutamine metabolism in macrophages: a novel target for obesity/Type 2 diabetes. *Advances in Nutrition*, **10**(2), 321-330.

Shapouri- Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S A, Mardani F, Sahebkar A, 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, **233**(9), 6425-6440.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P, 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer*, **42**(6), 717-727.

https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html

https://www.who.int/hiv/data/en/.

9. SAŽETAK

Makrofagi imaju temeljnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva i obrani organizma od patogena. Različita tkivna mikrookruženja, kao i njihove patološke promjene, mogu duboko utjecati na polarizacijsko stanje makrofaga prema ekstremnim fenotipovima M1 (proupalnom) i M2 (protuupalnom), kako bi se javio najprikladniji tip i intenzitet imunosnog odgovora. Međutim, u ovom radu prikazana je njihova tendencija zauzimanja istaknutih uloga u uspostavi i razvoju tumora, virusnoj infekciji te bolesti, upalnih i metaboličkih, koje danas imaju velik negativan učinak na čovječanstvo.

Stoga bi razumijevanje funkcionalne raznolikosti ovih stanica u zdravlju i bolesti, kao i mehanizama koji kontroliraju te događaje, bilo ključno za osmišljavanje strategija za reguliranje tih bolesti i ponovno uspostavljanje homeostaze.

10. SUMMARY

Macrophages have a fundamental role in maintaining tissue homeostasis and defence against pathogens. Different tissue microenvironments, as well as their pathological alterations, can have a profound influence on the polarization state of macrophages towards extreme M1 (proinflammatory) and M2 (antiinflammatory) phenotypes, to provide the most appropriate type and intensity of the immune response. However, this paper demonstrates their tendency to occupy prominent roles in the establishment and development of tumors, viral infections and diseases, inflammatory and metabolic, which today have a great negative impact on humanity.

Therefore, understanding the functional diversity of these cells in health and illness, as well as the mechanisms that control these events, is crucial to design strategies for regulating these diseases and re-establishing homeostasis.