

Krzysztof BRYNIARSKI

Katedra Immunologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Immunologiczna funkcja makrofagów gonady męskiej

Immunological function of testicular macrophages

Słowa kluczowe:

- makrofagi
- gonada męska

Key words:

- macrophages
- testis

Makrofagi gonady męskiej – makrofagi jądrowe (TMf) stanowią populację niezapalnych makrofagów tkankowych. Zlokalizowane są w tkance śródmiąższowej jądra, gdzie podlegają podziałom i fizjologicznie nie pojawiają się w świetle kanalików nasennych. Makrofagi jądrowe i komórki *Sertoliego* biorą udział w tworzeniu bariery krew-jądro, która tworzy z jądra narząd uprzywilejowany immunologicznie. Makrofagi jądrowe pośrednio i bezpośrednio regulują aktywność wydzielniczą komórek *Leydiga* i proces spermatogenezy. Pomiedzy makrofagami, komórkami *Leydiga* i *Sertoliego* istnieją silne funkcjonalne zależności w których pośredniczą mediatory o charakterze hormonalnym i cytokinowym. Wzajemne zależności komórek jądra, które biorą udział w tworzeniu immunologicznej niezależności jądra są tematem niniejszej pracy ze szczególnym uwzględnieniem roli makrofagów. Chociaż lokalizacja makrofagów jądrowych a częściowo ich biologia zostały wcześniej przedstawione przez innych badaczy ich aktywność immunologiczna pozostawała nieznana do czasu opracowania metody izolacji czystej populacji makrofagów gonady męskiej myszy [A]. Pierwszym celem badań było opracowanie prostej i efektywnej metody izolacji TMf. Komórki izolowane z tkanki śródmiąższowej gonady mysiej metodą enzymatyczną i mechaniczną stanowią mieszaninę makrofagów, komórek *Leydiga* i miofibroblastów. Metoda izolacji makrofagów jądrowych polega na ich separacji w schodkowym gradiencie Ficollu lub Percollu na kilka frakcji zależnych od gęstości komórek mieszaniny. Następnie z mieszaniny makrofagi podlegały dalszej izolacji jako komórki wykazujące pozytywną ekspresję powierzchniowego receptora $Fc\gamma R$ przy użyciu testu rozetowego z użyciem opsonizowanych krwinek i były sedymentowane w gradiencie Lymphoprepu, gdzie ich czystość oceniana jako procent komórek rozetujących i estero-pozytywnych wynosiła co najmniej 95%. Tak izolowane subpopulacje TMf różniły się między sobą aktywnością wydzielniczą $TNF-\alpha$ i IL-6, co wstępnie sugerowało ich odmienną biologiczną funkcję pełnioną w jądrach [B].

Następnie badania ukierunkowane zostały na określenie immunoregulacyjnej funkcji TMf w testach *in vivo* i *in vitro* [D]. Do izolacji TMf zastosowano wcześniej opisaną metodę izolacji TMf przy użyciu technik adherencji, rozetowania z opsonizowanymi erytrocytami i rozdziału w schodkowym gradiencie Percollu [B]. Ich aktywność w prezentacji antygeny w odpowiedzi humoralnej testowano *in vitro* (przy użyciu testu tworzenia plaków hemolitycznych w hodowli *Mishell-Duttona*) a także w odpowiedzi komórkowej, którą oceniano *in vitro* przy użyciu testu proliferacyjnego i *in vivo* z zastosowaniem testu nadwrażliwości kontaktowej. Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że makrofagi jądrowe reprezentują różnorodną populację komórek. Cięższe frakcje izolowane w gradiencie *Percollu* produkują śla-

dową ilość $TGF-\beta$ i są efektywnymi komórkami prezentującymi antygen w odpowiedzi humoralnej oraz odpowiedzi typu komórkowego. Natomiast frakcje niskiej gęstości, które stanowią większość TMf intensywnie produkują $TGF-\beta$ i są komórkami o działaniu raczej supresyjnym (tolerogennym) niż immunogennymi. Ich aktywność immunosupresyjna może ulegać zniesieniu, gdy dawcom TMf podano dożylnie cyklofosfamid na dzień przed ich zbiorom lub *in vitro* poprzez zastosowanie przeciwciał anty- $TGF-\beta$. Pełna, nie rozdzielana w gradiencie Percollu populacja TMf posiada aktywność immunosupresyjną jedynie w reakcjach typu komórkowego, ale nie humoralnego. Można zatem wnosić, że różniące się gęstością subpopulacje TMf wykazujące odmienne i specyficzne własności w generowaniu odpowiedzi immunologicznej w jądrze, pozostają jednak pod kontrolą subpopulacji TMf produkujących aktywnie $TGF-\beta$, które stanowią większość, co minimalizuje ryzyko rozwoju reakcji autoalergiczych w jądrze [D].

Kolejne badania miały na celu porównanie, w jaki sposób odmienne metody izolacji TMf (enzymatyczna lub mechaniczna) mogą wpływać na produkcję wybranych cytokin i reaktywnych form tlenu (ROI's) przez izolowane populacje TMf. Jako makrofagi kontrolne stosowano indukowane olejem mineralnym makrofagi otrzewnowe (P-Mf) [E].

PMf wykazywały wyższy poziom produkcji $TNF-\alpha$, IL-6, IL-10 i IL-12 niż TMf a traktowanie kolagenazą wzmagало sekrecję badanych cytokin (za wyjątkiem IL-12) w obu populacjach komórkowych. Efekt ten był wyraźnie mocniej zaznaczony w TMf. W odróżnieniu od P-Mf TMf stymulowane zymosanem wydzielaly niewielką ilość (ROI's). Na podstawie tych wyników domniamać można, że w przypadku lokalnych procesów zapalnych w jądrze brak wydzielania rodników tlenowych przez TMf nie prowadzi do niespecyficznego uszkodzenia tkanki jądra kierując lokalną odpowiedź immunologiczną na drogę odpowiedzi humoralnej [E].

W przypadku badania wpływu różnych stężeń enzymów proteolitycznych (metaloproteinaz i proteaz serynowych) na aktywność makrofagów konieczne było użycie, w zastępstwie trudno dostępnych TMf, rezydualnych a także indukowanych olejem makrofagów otrzewnowych myszy [C]. Ta zmiana uwarunkowana była niską efektywnością izolacji TMf, co w konsekwencji uniemożliwiało dogłębne badania tego problemu na populacji TMf. Wyniki badań i dowodzą, że enzymatyczne traktowanie makrofagów zmienia ekspresję ich markerów powierzchniowych oraz ma poważne i długotrwałe konsekwencje w aktywacji wydzielania cytokin zapalnych i rodników tlenowych przez makrofagi w sposób zależny od stężenia użytych enzymów i wciąż widoczny przy bardzo niskich ich stężeniach. Obserwowane zmiany mogą w następstwie prowadzić do aktywacji produkcji białek ostrej fazy i tym samym uruchamiać niezależną drogę hamowania procesu zapalnego [C]. Ta końcowa faza badań nad TMf pozwala na generalizację wniosków, że enzymatyczna izolacja makrofagów tkankowych może w konsekwencji stosowania proteolizy istotnie wpływać na funkcjonalną zmianę aktywności izolowanych komórek, co sugeruje konieczność krytycznej oceny uzyskanych wyników lub rozważenia, jeśli to możliwe, innej nie enzymatycznej metody w celu izolacji makrofagów tkankowych [F].

Adres do korespondencji:

Dr hab. n. med Krzysztof Bryniarski

Katedra Immunologii Collegium Medicum

Uniwersytetu Jagiellońskiego

31-121 Kraków, ul. Czysza 11

e-mail: krzysztofbryniarski2001@yahoo.com

Testicular macrophages (TMf) represent the population of non-inflammatory tissue macrophages. They are located in the interstitial tissue, where they are able to proliferate, but physiologically they do not appear in the seminiferous tubules. Testicular macrophages and Sertoli cells participate in the mechanism of blood-testis barrier which makes testis an immunologically privileged organ. Testicular macrophages acting paracrinally, directly or indirectly, regulate the endocrinal activity of Leydig cells and spermatogenesis. Mutual relations between macrophages, Leydig cells and Sertoli cells suggest their strong functional dependence as well as cooperation in immune and endocrine systems. Testicular cell relations, which take part in the formation of testis immune independence in particular reference to TMf, are explored in this thesis. Although localization of TMf has already been shown by others, their immunological activities remained unknown until our first isolation of pure TMf population [A]. So our first aim was to establish the easiest and efficient mechanical and enzymatic procedures to obtain pure populations of testicular mouse macrophages. The cells isolated from the interstitial tissue of mouse male gonads are composed of macrophages, Leydig cells and myofibroblasts. They can be separated on density gradients, either by sedimentation (Ficoll) or flotation (Percoll) into several fractions according to the different buoyant densities of the different cells in the mixture. Macrophages (FcR+, esterase+) present in the cell mixtures can be highly enriched (over 95% purity) in a single step by rosetting with opsonised erythrocytes followed by sedimentation on Lymphoprep. Separate fractions of highly purified macrophages obtained by successive use of density gradients and rosetting differ significantly in the production of cytokines (IL-6 and TNF- α) which suggests that particular subpopulations of testicular macrophages play different biological roles in the testis [B].

Further experiments were aimed to test immunoregulatory functions of TMf *in vivo* and *in vitro* [D]. TMf were purified by glass adherence, fractionation on discontinuous Percoll gradient and rosetting with opsonised erythrocytes according to the method described previously [B]. Their antigen presenting activity in humoral and cell-mediated immune responses was tested *in vitro* (Mishell-Dutton cultures, proliferation assay) and *in vivo* (induction of contact sensitivity reaction to TNP hapten). It was confirmed that TMf represent a heterogeneous cell population. Heavier Percoll fractions produce little transforming growth factor (TGF- β) and are efficient antigen-presenting cells in humoral and cell-mediated immune responses. Lighter fractions produce high amounts of TGF- β and are rather tolerogenic than immunogenic. Their immunosuppressive activity can be blocked by treatment of TMf donors with cyclophosphamide or *in vitro* by anti-TGF- β monoclonal antibody. In non-separated TMf population the immunosuppressive activity prevails. It was concluded, that subpopulation of TMf able to trigger specific immune responses is present in the testis but remains under control of other TGF- β producing TMf subpopulation which form a majority of TMf that minimizes the risk of development of autoimmune reactions [D].

In the following study we isolated TMf from testicular tissues

using previously described methods – mechanical (M-TMf) or enzymatic, by treatment with collagenase (E-TMf) and then we studied several cytokines and reactive oxygen intermediates (ROI's) production by these cells. Similarly treated oil-induced peritoneal macrophages (PMf) were used as control cells [E].

PMf had a higher baseline production of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 than M-TMf and collagenase treatment increased the release of these cytokines (except IL-12) by both cell populations. This effect was stronger in TMf. In contrast to PMf, TMf produced little ROI's when stimulated by zymosan. On the basis of those results it is concluded that in case of inflammatory stimulus in testis ROI's – negative TMf do not contribute to the tissue damage and instead may direct the local immune response into humoral pathway [E].

In case of testing the influence of different concentrations of proteolytic enzymes (metalloproteinase and serine protease) on the activity of macrophages the population of resident as well as oil induced peritoneal mouse macrophages were used instead of TMf. The reason was the inefficient harvest of TMf that did not allow profound insight in the function of TMf in comparison to easy obtained peritoneal cells commonly used as a population of pure macrophages. This part of the study [C] shows that enzymatic treatment of Mf imitates that found in the environment of inflammatory foci; it changes macrophage surface protein receptors and has strong and long lasting influence on the secretion of inflammatory cytokines as well as reactive oxygen intermediates. These effects were enzyme dose dependent and were still observed when low doses of enzymes were used. It is hypothesised that alterations in Mf activities induced by their enzymatic treatment can stimulate the anti-inflammatory regulatory pathway of immune response through production of acute phase proteins [C]. Our study indicates that isolation of tissue macrophages by enzymatic treatment may influence their functional activities, and suggest the necessity of critical evaluation of results when enzymatic methods are used to obtain these cells [F].

Niniejszą pracę stanowi monograficzny zbiór niżej wymienionych prac:

- A) Bryniarski K.: Makrofagi gonady męskiej. *Post Biol Kom* 2000; 27: 505-525.
- B) Bryniarski K., Szewczyk K., Ptak M., Bobek M., Ptak W.: A two step procedure to fractionate mouse testicular macrophages with different cytokine profiles. *Arch Immunol Ther Exp* 2002, 50: 225-229.
- C) Bryniarski K., Maresz K., Szczepanik M., Ptak M., Ptak W.: Modulation of macrophage activity by proteolytic enzymes. Different regulation of IL-6 and reactive oxygen intermediates (ROIs) synthesis as a possible homeostatic mechanism in the control of inflammation. *Inflammation* 2003; 27: 333-340.
- D) Bryniarski K., Szczepanik M., Maresz K., Ptak M., Ptak W.: Subpopulations of mouse testicular macrophages and their immunoregulatory function. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:27-35.
- E) Bryniarski K., Szczepanik M., Ptak M., Ptak W.: Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43: 37-41.
- F) Bryniarski K., Szczepanik M., Ptak M., Ptak W.: The influence of collagenase treatment on the production of TNF- α , IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. *J Immunol Methods* 2005; 301: 186-189.