

УДК 616-092.9:611.018.53

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO ЭКСПРЕССИИ TNF- α , IFN- γ И ИНТЕГРИНОВ- β 1 И - β 2 У МНОГОЯДЕРНЫХ МАКРОФАГОВ БЦЖ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Ильин Д.А.

НИИ экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ ФИЦ ФТМ, Новосибирск, e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru

Аннотация. В культурах перитонеальных клеток интактных и БЦЖ-инфицированных мышей линии BALB/c исследовали особенности реализации у макрофагов процессов amitotического деления ядер и клеточного слияния, а также экспрессии у макрофагов TNF- α , IFN- γ и интегринов- β 1 и - β 2. Известно, что эти цитокины и молекулы клеточной поверхности участвуют в реализации процесса слияния макрофагов. Причем реакции клеточной фузии и amitotического деления ядер являются механизмом мультинуклеации макрофагов. Согласно результатам проведенного исследования, в культурах перитонеальных клеток БЦЖ-инфицированных мышей наблюдали значительное возрастание частоты встречаемости бинуклеарных и многоядерных макрофагов по сравнению с контролем. Образование этих бинуклеарных и многоядерных макрофагов в культурах перитонеальных клеток было преимущественно обусловлено процессом клеточного слияния, о чем свидетельствует характер экспрессии изученных цитокинов и молекул клеточной поверхности. Отмечали, что их экспрессия у макрофагов в культурах перитонеальных клеток, выделенных от БЦЖ-инфицированных мышей, имела существенно большую интенсивность, чем в интактных клеточных культурах. Причем в интактных культурах перитонеальных клеток бинуклеарные и многоядерные макрофаги наиболее часто экспрессировали IFN- γ и интегрины- β 1 по сравнению с одноядерными макрофагами. Однако в культурах перитонеальных клеток, выделенных от БЦЖ-инфицированных мышей, бинуклеарные и многоядерные макрофаги чаще экспрессировали TNF- α и интегрины- β 2, чем мононуклеарные макрофаги. Поскольку многоядерные макрофаги вовлечены в гранулемогенез, являющейся базисным процессом развития туберкулезного гранулематоза, то представляется актуальным изучение реакций образования многоядерных макрофагальных форм, характеризующихся высоким функциональным потенциалом, обеспечивающим провоспалительную, профиброзную и прореструктивную активность этих клеток.

Ключевые слова: многоядерные макрофаги; amitоз; клеточная фузия; цитокины; интегрины; БЦЖ-гранулематоз.

IN VITRO STUDY OF THE EXPRESSION OF TNF-, IFN- AND INTEGRINS- β 1 AND - β 2 IN MULTINUCLEATED MACROPHAGES OF BCG-INFECTED MICE

Ilin D.A.

Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of FSBRI FRC FTM, Novosibirsk, e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru

Annotation. In cultures of peritoneal cells of intact and BCG-infected BALB/c mice, the peculiarities of the implementation of the processes of amitotic nuclear division and cell fusion in macrophages, as well as the expression of TNF- α , IFN- γ and integrins- β 1 and - β 2 in macrophages were studied. It is known that these cytokines and cell surface molecules are involved in the process of macrophage fusion. Moreover, the reactions of cell fusion and amitotic nuclear division are the mechanism of macrophage multinucleation. According to the results of the study, in cultures of peritoneal cells of BCG-infected mice, a significant increase in the frequency of occurrence of binuclear and multinucleated macrophages was observed compared with the control. The formation of these binuclear and multinucleated macrophages in peritoneal cell cultures was mainly due to the process of cell fusion, as evidenced by the nature of the expression of the studied cytokines and cell surface molecules. It was noted that their expression in macrophages in cultures of peritoneal cells isolated from BCG-infected mice had a significantly higher intensity than in intact cell cultures. Moreover, in intact cultures of peritoneal cells, binuclear and multinucleated macrophages most often expressed IFN- γ and integrins- β 1 compared with mononuclear macrophages. However, in cultures of peritoneal cells isolated from BCG-infected mice, binuclear and multinucleated macrophages expressed TNF- α and integrins- β 2 more often than mononuclear macrophages. Since multinucleated macrophages are involved in granulomogenesis, which is the basic process of the development of tuberculous granulomatosis, it seems relevant to study the reactions of the formation of multinucleated macrophage forms characterized by high functional potential, providing proinflammatory, profibrotic and prodestructive activity of these cells.

Keywords: multinucleated macrophages; amitosis; cell fusion; cytokines; integrins; BCG-granulomatosis.

Прежде всего, отметим факт существования проблемы многоядерных клеток [1-3] различного происхождения, широко представленной в научной литературе и охватывающей комплекс многочисленных [3-5], в том числе теоретических, аспектов и непосредственно касающейся актуальных прикладных задач [5]. При этом немаловажно, что существуют, в частности, многоядерные клетки макрофагального происхождения [6], поскольку их формирование отмечается при патологических процессах, определяющих развитие обширного ряда распространенных заболеваний [5]. К ним можно причислить гранулематозные заболевания различной этиологии, поскольку в их патогенезе велико значение многоядерных макрофагов, и среди этих нозологий особенно выделяется обладающий социальной значимостью туберкулезный гранулематоз, исследование патогенеза которого представляет собой весьма актуальную проблему [6].

Несомненно, что изучение механизмов мультиядерности макрофагов способствует успешному решению прикладных задач разработки методов терапевтической коррекции и диагностики заболеваний, в патогенезе которых полинуклеарные макрофаги играют ведущую роль. Последний аспект связан с тем фактом, что в условиях туберкулезного гранулематоза многоядерные макрофаги обладают высоким уровнем цитофизиологической активности в отношении продукции провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и выраженной фагоцитозной способностью, существенно превосходя в этом плане мононуклеарные макрофаги [6].

Известно, что многоядерные макрофаги формируются за счет клеточного слияния и amitotического деления ядра, которое по сравнению с клеточной фузией имеет второстепенное значение в мультиядерности макрофагов в патологических условиях, но клеточное слияние преимущественно обеспечивает образование макрофагальных клеточных производных, включая гигантские многоядерные полинуклеары, присутствующие в очагах хронического воспаления [5].

Вследствие того что реакции клеточного слияния осуществляются при посредстве цитокинов, контролирующих клеточную фузию, то необходимо привести следующий факт. Процесс образования многоядерных клеток обеспечивается различными медиаторами [7], но, несмотря на то, что цитокины имеют полифункциональное значение, вполне возможно указать их роль в клеточной фузии. В частности, индукторами мультиядерности являются IFN- γ и TNF- α [7]. Также требуется отметить значение молекул клеточной адгезии [8], поскольку, например, $\beta 1$ и $\beta 2$ интегрин экспрессируются на сливающихся макрофагах [9]. Иными словами, молекулы клеточной поверхности играют важную роль в реакциях клеточного слияния, напрямую

обуславливая реализацию такового и представляя вместе с цитокинами необходимый компонент рассматриваемого процесса, детерминирующего мультиядерность макрофагов [5].

Цель работы – изучить в условиях БЦЖ-гранулематоза характер экспрессии у разнящихся по классам ядерности макрофагов цитокинов и молекул клеточной поверхности, играющих роль в клеточном слиянии, обуславливающем образование многоядерных макрофагов, имеющих значение в гранулемогенезе.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись культуры клеток перитонеального транссудата мышей-самцов линии BALB/c. Контрольная группа сформирована из культур перитонеальных клеток, выделенных от интактных мышей линии BALB/c. Экспериментальная группа была представлена культурами перитонеальных клеток, выделенных от БЦЖ-инфицированных мышей той же линии через 3 месяца (период формирования гранулем) после внутрибрюшинного введения им вакцины БЦЖ в дозе 0,5 мг в 0,25 мл изотонического водного раствора NaCl [6]. Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Мышей выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом [6]. Время инкубации перитонеальных клеток *in vitro* (при 37°C) составляло 48 часов. Использовали культуральную среду 199 (10^6 клеток в 2 мл среды). Фиксация клеточных культур проводилась 4%-ным водным раствором формальдегида.

Цитологические препараты культур перитонеальных клеток анализировали с помощью методов световой микроскопии при увеличении в 400 раз. Определяли относительную численность (%) бинуклеарных и собственно многоядерных макрофагов (с 3 и более ядрами), а также макрофагов с цитоморфологическими признаками amitotического деления клеточных ядер, клеточного слияния и с иммуноцитохимическими признаками экспрессии TNF- α , IFN- γ и интегринов- β 1 и - β 2, принимая за 100% число клеток с соответствующими признаками в пределах каждого класса ядерности. Анализ экспрессии TNF- α , IFN- γ и интегринов- β 1 и - β 2 у макрофагов осуществляли непрямым иммуноцитохимическим методом с использованием диагностических наборов моноклональных антител.

В процессе статистической обработки результатов проведенного исследования оценивали величины средней арифметической и ее стандартной ошибки, определяли вероятность достоверности различий между сравниваемыми средними величинами, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия между сравниваемыми средними величинами являлись достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В культурах перитонеальных клеток контрольной группы отмечалась достаточно низкая частота встречаемости бинуклеарных и в особенности одноядерных макрофагов с цитоморфологическими признаками клеточного слияния, причем многоядерные макрофаги практически не участвовали в реакциях клеточной фузии (табл.), чем, по мнению автора, может быть объяснено низкое относительное содержание в интактных культурах перитонеальных клеток бинуклеарных и многоядерных макрофагов ($3,3 \pm 0,3$ %).

Относительная численность макрофагов (%) в культурах перитонеальных клеток мышей с признаками мультиядерности и экспрессии TNF- α , IFN- γ , Integrin- β 1, Integrin- β 2

Показатель	Интактные мыши			БЦЖ-инфицированные мыши		
	Количество ядер в макрофагах			Количество ядер в макрофагах		
	1	2	3 и более	1	2	3 и более
Амитоз	$1,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,2 \blacklozenge$	$6,6 \pm 1,0 \blacklozenge$	$2,8 \pm 0,2^*$	$6,0 \pm 0,5^* \blacklozenge$	$9,0 \pm 2,0 \blacklozenge$
Фузия	$0,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2 \blacklozenge$	$0 \blacklozenge$	$4,8 \pm 0,8^*$	$12,0 \pm 1,0^* \blacklozenge$	$14,6 \pm 1,5^* \blacklozenge$
TNF- α	$1,5 \pm 0,2$	$0 \blacklozenge$	$0 \blacklozenge$	$11,0 \pm 1,3^*$	$32,0 \pm 3,2^* \blacklozenge$	$23,0 \pm 2,0^* \blacklozenge$
IFN- γ	$11,0 \pm 1,0$	$21,9 \pm 2,0 \blacklozenge$	$63,5 \pm 4,5 \blacklozenge$	$84,0 \pm 3,0^*$	$83,0 \pm 6,6^*$	$78,3 \pm 3,5^*$
Integrin- β 1	$12,8 \pm 2,0$	$47,0 \pm 4,4 \blacklozenge$	$29,0 \pm 2,9 \blacklozenge$	$79,5 \pm 6,0^*$	$73,3 \pm 3,0^*$	$92,0 \pm 8,0^*$
Integrin- β 2	$1,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$0 \blacklozenge$	$45,0 \pm 3,0^*$	$70,0 \pm 5,7^* \blacklozenge$	$75,0 \pm 7,5^* \blacklozenge$

Примечание: группы включали одинаковое количество (n) образцов культур клеток (n = 6);

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем при межгрупповом сравнении; $\blacklozenge p < 0,05$ по сравнению с одноядерными макрофагами при сопоставлении данных в пределах одной группы культур.

В то же время присутствующие в интактных клеточных культурах многоядерные макрофаги, по-видимому, формировались преимущественно не вследствие клеточного слияния, но в результате амитотического деления ядер. Данный процесс клеточной мультиядерности, имеющий большое значение в образовании многоядерных макрофагов в интактных культурах перитонеальных клеток [5], был основным механизмом формирования не только собственно многоядерных, но и бинуклеарных макрофагов (табл.).

Говоря о продукции макрофагами цитокинов, контролирующей процесс клеточного слияния, следует заметить, что, например, экспрессия TNF- α , являющегося индуктором фузии макрофагов, была отмечена только у весьма незначительного количества мононуклеарных макрофагов, тогда как у двуядерных и полинуклеарных макрофагальных производных таковая практически отсутствовала (табл.). В то же время продукция такого цитокина, как IFN- γ ,

наблюдалась у макрофагов, принадлежащих к различным классам ядерности (табл.). При этом максимальный уровень экспрессии IFN- γ был зарегистрирован у многоядерных макрофагов (табл.). Некоторая роль в индукции клеточного слияния принадлежала бинуклеарным и одноядерным макрофагам, присутствовавшим в интактных культурах, но значимо уступавшим полинуклеарам по интенсивности продукции IFN- γ (табл.).

У макрофагов наблюдалась экспрессия интегринов- $\beta 1$ и - $\beta 2$, непосредственно участвующих в обеспечении процесса клеточного слияния. Причем максимальный уровень экспрессии интегрин- $\beta 1$ был зарегистрирован у бинуклеарных макрофагов (табл.). Тем не менее, экспрессия интегрин- $\beta 2$ наблюдалась лишь у незначительного количества моно- и бинуклеарных макрофагов и практически отсутствовала у многоядерных макрофагальных производных (табл.).

В культурах перитонеальных клеток экспериментальной группы отмечался значительно иной характер реализации процессов мультинуклеации макрофагов, что было определено на основе учета цитоморфологических признаков наличия амитотического деления ядер, клеточного слияния, экспрессии у макрофагов изученных типов цитокинов и интегринов. Прежде всего, обращает на себя внимание существенно большая частота встречаемости бинуклеарных и особенно многоядерных макрофагов с признаками межклеточной фузии по сравнению с аналогичным показателем у моноклеаров (табл.), что детерминировало увеличение численности би- и полинуклеарных макрофагов до $11,5 \pm 0,4\%$ (* $p < 0,05$). Однако в макрофагальной мультинуклеации определенное значение имело и амитотическое деление ядер этих клеток (табл.).

Продукция индуцирующего процесс клеточного слияния TNF- α наблюдалась у макрофагов, принадлежащих к различным классам ядерности, но максимальный уровень продукции этого медиатора был зарегистрирован у бинуклеарных макрофагов, которым по данному показателю уступали полинуклеары и в значительно большей степени – одноядерные макрофаги (табл.). Однако независимо от принадлежности макрофагов к конкретному классу ядерности у них наблюдали исключительно высокий уровень продукции IFN- γ (табл.). Аналогичное утверждение было вполне справедливо в отношении характера экспрессии у макрофагов интегрин- $\beta 1$ (табл.). Однако уровень экспрессии у моноклеарных макрофагов интегрин- $\beta 2$ уступал таковому у интегрин- $\beta 1$ в культурах перитонеальных клеток экспериментальной группы (табл.).

Далее следует провести сравнительный анализ особенностей реализации обуславливающего мультинуклеацию макрофагов процесса их слияния. Несомненно, что

наблюдаемое в культурах перитонеальных клеток экспериментальной группы весьма существенное возрастание частоты встречаемости двуядерных и полинуклеарных макрофагов было обусловлено активизацией процесса клеточной фузии. На это непосредственно указывало в исключительной степени выраженное увеличение количества макрофагов, принадлежащих ко всем учитываемым классам ядерности, с признаками клеточного слияния в культурах экспериментальной группы по сравнению с контрольным уровнем названного показателя (табл.). Данная тенденция была наиболее характерна для многоядерных и в несколько меньшей степени – для бинуклеарных макрофагов (табл.).

В отношении учета иммуноцитохимических признаков продукции медиаторов и экспрессии молекул клеточной поверхности, детерминирующих процесс фузии макрофагов, можно заметить следующее. По сравнению с соответствующими контрольными показателями уровень экспрессии TNF- α , IFN- γ , а также интегринов- β 1 и - β 2 у разнящихся по классам ядерности макрофагов, присутствовавших в культурах перитонеальных клеток экспериментальной группы, в целом характеризовался как весьма высокий (табл.).

По сравнению с мононуклеарами бинуклеарные и многоядерные макрофаги в культурах экспериментальной группы имели высокую степень экспрессии TNF- α , практически отсутствующую у двуядерных и полинуклеарных клеток в интактных культурах (табл.). По показателю численности моно- и бинуклеарные макрофаги в культурах клеток экспериментальной группы многократно превосходили экспрессирующие IFN- γ макрофаги с соответствующими классами ядерности в интактных культурах (табл.).

Межгрупповые различия в отношении частоты встречаемости макрофагов, экспрессирующих интегрины- β 1 и - β 2, состояли в том, что моно- и полинуклеары, а также би- и полинуклеары приобретали наибольшую интенсивность экспрессии соответственно интегринов- β 1 и - β 2 (табл.). Причем по сравнению с исходным уровнем экспрессии интегринов- β 2 макрофаги, имеющие признаки таковой, превосходили клетки с экспрессией интегринов- β 1 (табл.). Небезынтересно отметить, что в ряде случаев наблюдалась выраженная экспрессия интегринов- β 1 и - β 2 на границе слияния макрофагов, которой предшествовала взаимная адгезия этих клеток друг к другу.

Таким образом, вследствие высокой интенсивности реализации процессов мультинуклеации макрофагов, детерминированных клеточным слиянием, в культурах перитонеальных клеток, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных, наблюдали существенное возрастание численности би- и полинуклеарных макрофагов по сравнению с

контрольным уровнем. Высокая степень продукции макрофагами цитокинов TNF- α и IFN- γ , контролирующая процессы клеточного слияния, и экспрессии у этих клеток интегринов- β 1 и - β 2, непосредственно участвующих в фузии макрофагов, обуславливала характер наблюдаемых реакций мультинуклеации макрофагов в культурах экспериментальной группы. По сравнению с моонуклеарными макрофагами отличительной особенностью бинуклеарных и многоядерных макрофагов являлась высокая степень экспрессии у них IFN- γ и интегринов- β 1 в интактных клеточных культурах, тогда как в культурах, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных, двуждерные и полинуклеарные макрофаги наиболее интенсивно экспрессировали TNF- α и интегрины- β 2.

Кроме того, учитывая наличие феномена M1/M2-поляризации макрофагов, следует отметить, что требуется оценка роли цитокинов и CD рецепторов, экспрессия которых указывает на характер макрофагальной дифференцировки в соответствующем направлении поляризации [10-12]. Это целесообразно принимать во внимание при исследовании процессов мультинуклеации клеток гистиоцитарного генеза, поскольку цитокины и молекулы клеточной поверхности обеспечивают такой механизм полинуклеации макрофагов, как их слияние [5].

В этом отношении перспективным представляется совместный учет комплекса соответствующих регуляторных и структурных белков, участвующих в обоих процессах (поляризации и мультинуклеации макрофагов), что объясняется возможным наличием между ними патогенетической взаимосвязи, обуславливающей формирование и дифференцировку многоядерных макрофагальных производных, участвующих в гранулемогенезе – патогенетической основе туберкулезного гранулематоза.

Заключение. Подводя общий итог обсуждения рассматриваемых в данной статье аспектов, следует заметить, что изучение у различающихся по классам ядерности макрофагов характера продукции медиаторов и экспрессии молекул клеточной поверхности, участвующих в реализации механизмов мультинуклеации этих клеток, вовлеченных в осуществление гранулемогенеза, лежащего в основе развития широкого ряда распространенных инфекционных гранулематозов, включая туберкулезный гранулематоз, необходимо для более ясного понимания особенностей его патогенеза.

Высокий функциональный потенциал многоядерных макрофагов, неоднократно превосходящих в этом отношении моонуклеарные формы и играющих регуляторную роль в реализации гранулемогенеза и в развитии фиброзных осложнений туберкулезного гранулематоза, требует учитывать при разработке перспективных методов цитологической диагностики этого

заболевания, поскольку многоядерные макрофаги являются клетками-маркерами туберкулезного гранулематоза, что следует принимать во внимание при прогнозировании его развития и при контроле эффективности проводимой терапии.

Список литературы

1. Jawad M.D., Go R.S., Reichard K.K., Shi M. Increased Multinucleated Megakaryocytes as an Isolated Finding in Bone Marrow: A Rare Finding and Its Clinical Significance // *American Journal of Clinical Pathology*. 2016. Vol. 146. Is. 5. P. 561-566. DOI: 10.1093/ajcp/aqw144.
2. Zhang Z., Zhao Y., Chen G., Li R., Yang J., Sun D. Study of lung toxicity in rats exposed to silica powder with different hard metal constituents // *Toxicology and Industrial Health*. 2018. Vol. 34. Is. 7. P. 449-457. DOI: 10.1177/0748233718758586.
3. Zhao Z., Paguette C., Shah A.A., Atkins K.A., Frierson H.F. Fine Needle Aspiration Cytology of Diffuse-Type Tenosynovial Giant Cell Tumors // *Acta Cytologica*. 2017. Vol. 61. Is. 2. P. 160-164. DOI: 10.1159/000457828.
4. Zhou W.L., Li L.L., Qiu X.R., An Q., Li M.H. Effects of Combining Insulin-like Growth Factor 1 and Platelet-derived Growth Factor on Osteogenesis around Dental Implants // *The Chinese journal of dental research*. 2017. Vol. 20. Is. 2. P. 105-109. DOI: 10.3290/j.cjdr.a38275.
5. Ильин Д.А. Многоядерные макрофаги. Новосибирск: Наука, 2011. 56 с.
6. Il'in D.A., Arkhipov S.A., Shkurupy V.A. In Vitro Study of Cytophysiological Characteristics of Multinuclear Macrophages from Intact and BCG-Infected Mice // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016. Vol. 160. Is. 5. P. 668-671. DOI: 10.1007/s10517-016-3245-1.
7. Hornik T.C., Neniskyte U., Brown G.C. Inflammation induces multinucleation of Microglia via PKC inhibition of cytokinesis, generating highly phagocytic multinucleated giant cells // *Journal of Neurochemistry*. 2014. Vol. 128. Is. 5. P. 650-661. DOI: 10.1111/jnc.12477.
8. Kim M.Y., Cho J.Y. Molecular association of CD98, CD29, and CD147 critically mediates monocytic U937 cell adhesion // *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016. Vol.20. Is. 5. P. 515-523. DOI: 10.4196/kjpp.2016.20.5.515.
9. McNally A.K., Anderson J.M. Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation // *American Journal of Clinical Pathology*. 2002. Vol. 160. Is. 2. P. 621-630. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)64882-1.

10. Seif M., Philippi A., Breinig F., Kiemer A.K., Hoppstadter J. Yeast (*saccharomyces cerevisiae*) Polarizes Both M-CSF- and GM-CSF-Differentiated Macrophages Toward an M1-Like Phenotype // *Inflammation*. 2016. Vol. 39. Is. 5. P. 1690-1703. DOI: 10.1007/s10753-016-0404-5.
11. Sha H., Zhang D., Zhang Y., Wen Y., Wang Y. ATF3 promotes migration and M1/M2 polarization of macrophages by activating tenascin-C via Wnt/ β -catenin pathway // *Molecular Medicine Reports*. 2017. Vol. 16. Is. 3. P. 3641-3647. DOI: 10.3892/mmr.2017.6992.
12. Huang Z., Gao C., Chi X., Hu Y.W., Zheng L., Zeng T., Wang Q. IL-37 Expression is Upregulated in Patients with Tuberculosis and Induces Macrophages Towards an M2-like Phenotype // *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015. Vol. 82. Is. 4. P. 370-379. DOI: 10.1111/sji.12326.