

УДК 611.018

ИЗУЧЕНИЕ IN VITRO ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МНОГОЯДЕРНЫХ МАКРОФАГОВ**Ильин Д.А.***ФГБНУ НИИ Экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск,
e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru*

В культурах перитонеальных клеток, выделенных от интактных мышей линии BALB/c, изучали особенности формирования и функционирования многоядерных макрофагов. Вероятно, что процесс клеточного слияния не играл существенной роли в мультинуклеации макрофагов в физиологических условиях, но amitotическое деление их ядер являлось основным механизмом формирования бинуклеарных и многоядерных макрофагов. О чем свидетельствовала частота встречаемости макрофагов с признаками amitotоза и продукции цитокинов, обеспечивающих клеточное слияние. Активность апоптоза многоядерных макрофагов была минимальной, что способствовало увеличению их численности. Фагоцитоз и бактерицидная способность макрофагов возрастали по мере увеличения класса ядерности этих клеток. Полученные данные свидетельствуют об особенностях образования и функционирования многоядерных макрофагов, которые участвуют в реализации патологических процессов, детерминирующих развитие ряда заболеваний.

Ключевые слова: многоядерные макрофаги, клеточное слияние, amitotоз, фагоцитоз**IN VITRO STUDY OF SPECIFIC OF FORMATION AND FUNCTION OF THE MULTINUCLEATED MACROPHAGES****Ilin D.A.***Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru*

In cultures of peritoneal cells isolated from intact mice of line BALB/c, we studied the peculiarities of formation and function of the multinucleated macrophages. It is likely that the process of cell fusion does not play a significant role in multinucleation of macrophages in physiological conditions, but amitosis of their nuclei is the major mechanism of formation binuclear and multinucleated macrophages. As evidenced by the frequency of occurrence of macrophages with signs of amitosis and production of cytokines that drive cell fusion. The activity of apoptosis in multinucleated macrophages were minimal. It contributed to increase their population. Phagocytosis and bactericidal ability of the macrophages increased with increasing grade of nucleus in these cells. The obtained data testify about the peculiarities of formation and functioning of multinucleated macrophages that participate in the realization of pathological processes that determine the development of diseases.

Keywords: multinucleated macrophages, cell fusion, amitosis, phagocytosis

Известно, что многоядерные макрофаги (МФ) формируются при развитии гранулематозных заболеваний различной этиологии, включая ряд инфекционных гранулематозов, в том числе туберкулез [2–4], чем определяется актуальность исследования процессов образования и функционирования многоядерных макрофагальных производных.

Одним из механизмов формирования многоядерных клеток считается слияние МФ [7], которое осуществляется посредством влияния цитокинов, контролирующих механизмы клеточного слияния [6, 8, 9]. В частности, показана роль гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в регуляции процесса слияния клеток [9], тогда как фактор некроза опухолей- α (TNF- α) относится к медиаторам, индуцирующим клеточную фузию [8]. Кроме того, amitotическое деление клеточных ядер также является механизмом образования макрофагальных полинуклеаров [1]. Однако требуется уточнение

характера мультинуклеации МФ и роли механизмов клеточного слияния и amitotического деления ядер в этом процессе.

В то же время к процессам противоположным образованию многоядерных МФ относится апоптоз указанных клеток. Например, механизм элиминации полинуклеаров в очаге хронического воспаления связан с их апоптозом [5]. Об индукции апоптоза свидетельствует экспрессия активированной каспазы-3 (Caspasa-3) [10].

Поскольку одними из наиболее важных функций МФ, включая их многоядерные производные, являются фагоцитоз и бактерицидная способность, определяемая по уровню продукции активных форм кислорода (АФК) [1], то самоочевидна актуальность изучения этих цитофизиологических особенностей многоядерных МФ, участвующих в патологических процессах, обуславливающих патогенез хронических гранулематозных заболеваний.

Целью работы являлось изучение характера реализации amitotического деле-

ния клеточных ядер, обуславливающего мультинуклеацию МФ, оценка продукции цитокинов, контролирующих клеточное слияние, детерминирующее образование многоядерных МФ, и экспрессии факторов, свидетельствующих об их апоптозе, а также исследование цитофизиологических особенностей многоядерных МФ (бактерицидной способности и фагоцитарной активности), формирующихся в первичных культурах перитонеальных клеток (ПК) интактных мышей.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили *in vitro* на клетках перитонеального транссудата мышей линии BALB/c. Клеточную суспензию получали после выведения животных из эксперимента методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом [1]. Клеточные культуры инкубировали в течение 48 часов на покровных стеклах (10^6 клеток в 2 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов коров) в культуральных планшетах при 37°C. Фиксацию клеточных культур проводили 4% водным раствором формальдегида на фосфатном буфере (pH 7,3).

В исследовании были использованы культуры ПК, выделенных от интактных животных. Для реализации каждого применяемого в исследовании метода анализа использовали 6 клеточных культур. В культурах ПК с помощью методов световой микроскопии оценивали относительную численность одноядерных, двуядерных и многоядерных (содержащих 3 и более ядер) перитонеальных МФ [1; 2] при увеличении в 400 раз.

Определяли частоту встречаемости различающихся по классам ядерности МФ с цитоморфологическими признаками amitotического деления ядер: формированием межъядерной перетяжки, межъядерной перегородки и отпочкованием фрагментов ядра. Идентификацию МФ, участвующих в клеточном слиянии, осуществляют путем регистрации МФ, продуцирующих ряд медиаторов, контролирующих процесс клеточного слияния [2]. При анализе результатов иммуноцитохимических исследований и функциональных тестов определяли долю МФ с указанными классами ядерности, имеющих соответствующие иммуноцитохимические признаки и морфофункциональные характеристики.

Оценку экспрессии GM-CSF, TNF- α , Caspasa-3 у МФ проводили непрямой иммуноцитохимическим методом [2] с использованием системы визуализации на основе биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса (Novocastra) и Anti-Rat Ig HRP Detection Kit (BD Pharmingen). Признаками экспрессии GM-CSF, TNF- α , Caspasa-3 у МФ считали наличие окраски цитоплазмы в коричневый цвет.

Оценку уровней продукции АФК проводили посредством НСТ-теста [1]. ПК инкубировали в среде 199, содержащей раствор нитросинего тетразолия (0,1%), в течение 1 часа при 37°C. Продукцию АФК определяли в результате учета количества образующегося в МФ формазана методом компьютерного морфометрического анализа при использовании программы «Видео-Тест-Морфо 3.2». При этом сумму площадей (мкм²) всех изображений гранул формазана, присутствующих в МФ, принимали за показатель

их содержания в клетке. Фагоцитарную активность МФ оценивали путем учета фагоцитарного числа (ФЧ), которым являлось среднее численное значение (N) объектов фагоцитоза (гранулы зимозана), приходящееся на один МФ.

При статистической обработке полученных данных вероятность достоверности различий между сравниваемыми средними величинами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Данные результатов анализа были представлены в виде $M \pm m$. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении исследования было установлено, что в интактных культурах ПК содержалось $4,0 \pm 0,2\%$ и $0,6 \pm 0,1\%$ соответственно бинуклеарных и многоядерных МФ. В этих клеточных культурах было зарегистрировано минимальное количество одноядерных МФ с признаками экспрессии маркера апоптоза Caspasa-3 (при практическом отсутствии экспрессии у двуядерных и многоядерных МФ) и продукции цитокина TNF- α , индуцирующего процесс апоптоза (таблица). В то же время, поскольку TNF- α является также индуктором клеточного слияния, детерминирующего мультинуклеацию МФ, то минимальный уровень его продукции (таблица) мононуклеарными МФ (при практическом отсутствии таковой у бинуклеаров и многоядерных макрофагальных производных) указывает на то, что в интактных культурах ПК индукция процессов апоптоза и формирования двуядерных и полинуклеарных МК за счет клеточной фузии играет незначительную роль.

Однако относительная численность МФ, продуцирующих регулятор процесса клеточного слияния GM-CSF, была существенно выше (таблица), чем МФ, синтезирующих TNF- α (за исключением полинуклеарных форм макрофагальных производных), но учитывая абсолютное количество присутствующих в культурах МФ, вероятно, не оказывало заметного влияния на активизацию процесса мультинуклеации клеток.

В противоположность сказанному заметим, что, судя по интенсивности amitotического деления ядер МФ, оно имело решающее значение для процесса формирования бинуклеарных и многоядерных МФ. При этом наблюдалось прогрессивное увеличение численности МФ с признаками amitotического деления их ядер в соответствии с классом ядерности таковых (таблица). Основной формой amitotического деления ядер МФ являлось образование межъядерной перетяжки между фрагментами исходной структуры.

Цитофизиологические характеристики МФ в культурах ПК мышей линии BALB/c (M ± m)

Учитываемый показатель	Количество ядер в МФ		
	1	2	3 и более
Амитоз (%)	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2*	7,0 ± 0,7* **
GM-CSF (%)	4,7 ± 0,4	7,0 ± 0,6*	< 0,1
TNF-α (%)	1,5 ± 0,2	< 0,1	< 0,1
Caspasa-3 (%)	0,9 ± 0,1	< 0,1	< 0,1
Фагоцитарное число (N)	4,0 ± 0,4	7,0 ± 0,8*	9,0 ± 0,8*
Объем формазана (мкм ²)	26,0 ± 3,0	37,4 ± 4,0*	56,0 ± 5,3* **

Примечание. *p < 0,05 по сравнению с одноядерными и **p < 0,05 с бинуклеарными МФ.

Активность фагоцитоза увеличивалась по мере возрастания класса ядерности МФ, о чем свидетельствовало соответствующее изменение уровня показателя ФЧ (таблица). Аналогичная ситуация наблюдалась в отношении интенсивности продукции АФК, определяемой при проведении НСТ-теста путем учета объема формазана, содержащегося в МФ, различающихся по классам ядерности (таблица). Данные выводы подтверждают установленные факты, свидетельствующие о гетерогенности популяции МФ в цитофизиологическом плане [1] и о том, что класс ядерности МФ детерминирует их функциональные особенности [1; 2].

Заключение

Таким образом, в интактных культурах ПК основным механизмом, обеспечивающим образование полинуклеарных МФ, следует считать амитотическое деление ядер. Об этом свидетельствует высокая численность МФ с признаками амитоза. Причем низкий уровень содержания МФ с экспрессией как регулятора клеточного слияния GM-CSF, так и его индуктора TNF-α указывает на незначительное участие механизма фузии в процессе мультинуклеации МФ в интактных культурах ПК. В то же время интенсивность апоптоза МФ следует считать минимальной, что обуславливало относительно высокую численность бинуклеарных и многоядерных МФ в клеточных культурах. Такие показатели функциональной активности МФ, как фагоцитоз и их бактерицидная способность, возрастали по мере увеличения класса ядерности клеток. Полученные данные целесообразно использовать при проведении комплекса исследований фундаментальных процессов формирования и функциониро-

вания многоядерных МФ, играющих роль в патогенезе хронических гранулематозных заболеваний.

Список литературы

1. Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ильин Д.А., Игнатович Н.В., Ахраменко Е.С., Архипова В.В. Образование и некоторые цитофизиологические характеристики многоядерных макрофагов в первичных культурах перитонеальных клеток // Бюл. exper. биол. мед. – 2008. – Прил. 1. – С. 89–93.
2. Ильин Д.А., Архипов С.А., Шкурупий В.А. Исследование in vitro экспрессии ИЛ-1α, GM-CSF и ФНО-α многоядерными макрофагами БЦЖ-инфицированных мышей // Бюл. exper. биол. мед. – 2013. – Т. 155, № 5. – С. 615–618.
3. Ильин Д.А., Архипов С.А., Шкурупий В.А. Исследование in vitro цитофизиологических характеристик многоядерных макрофагов от интактных и БЦЖ-инфицированных мышей // Бюл. exper. биол. мед. – 2015. – Т. 160, № 11. – С. 617–621.
4. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. – М., Изд-во РАМН, 2007. – 536 с.
5. Brodbeck W.G., Shive M.S., Colton E., Ziats N.P., Anderson J.M. Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages // J. Lab. Clin. Med. – 2002. – V. 139. – № 2. – P. 90–100.
6. Flad H.D., Grage-Griebenow E., Petersen F., Scheuerer B., Brandt E., Baran J., Pryjma J., Ernst M. The role of cytokines in monocyte apoptosis // Pathobiology. – 1999. – V. 67. – № 5–6. – P. 291–293.
7. Helming L., Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion // Immunobiology. – 2007. – V. 212. – № 9–10. – P. 785–793.
8. Kim K., Lee S.H., Ha Kim J., Choi Y., Kim N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) // Mol. Endocrinol. – 2008. – V. 22. – № 1. – P. 176–185.
9. Lee M.S., Kim H.S., Yeon J.T., Choi S.W., Chun C.H., Kwak H.B., Oh J. GM-CSF regulates fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts by activating the Ras/ERK pathway // J. Immunol. – 2009. – V. 183. – № 5. – P. 3390–3399.
10. Rana S.V. Metals and apoptosis: recent developments // J. Trace. Elem. Med. Biol. – 2008. – V. 22. – № 4. – P. 262–284.