

УДК 611.018:616-092.9

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА BAD И BCL-2 МНОГОЯДЕРНЫМИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ БЦЖ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Ильин Д.А.

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

В популяциях одноядерных и многоядерных макрофагов в первичных культурах перитонеальных клеток интактных и БЦЖ-инфицированных мышей линии BALB/c проводили изучение особенностей экспрессии белков-регуляторов, обладающих проапоптогенным (Bad) и антиапоптоическим (Bcl-2) эффектом. В культурах перитонеальных клеток контрольной и экспериментальных групп многоядерные макрофаги обладали различиями в степени интенсивности экспрессии апоптоических и антиапоптоических факторов по сравнению с одноядерными. В культурах экспериментальных групп макрофаги имели различия в экспрессии апоптоических и антиапоптоических факторов по сравнению с контролем. Снижение численности бинуклеарных и многоядерных макрофагов с признаками экспрессии белка Bcl-2 отмечалось на 3-месячный срок наблюдения. На этот же срок наблюдения возросло количество экспрессирующих белок Bad многоядерных макрофагов. Полученные данные свидетельствуют об особенностях динамики регуляции апоптоза у субпопуляций макрофагов, различающихся по классам ядерности, в условиях БЦЖ-инфицированности. Кроме того, были описаны различные варианты локализации белков Bad и Bcl-2 в цитоплазме макрофагов, которые были обусловлены спецификой реализации внутриклеточных процессов, протекающих в цитоплазме этих клеток. Данные особенности следует учитывать при проведении цитологического анализа клеточных культур, содержащих различающиеся по классам ядерности макрофаги.

**Ключевые слова:** многоядерные макрофаги, апоптоз, белки Bad и Bcl-2

## THE STUDY OF EXPRESSION OF PROTEINS-REGULATORS OF APOPTOSIS BAD AND BCL-2 BY MULTINUCLEATED PERITONEAL MACROPHAGES OF BCG-INFECTED MICE

Ilin D.A.

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

In populations of mononuclear and multinuclear macrophages in primary cultures of peritoneal cells intact and BCG-infected mice of line BALB/c was carried out studying of features of expression of proteins-regulators with proapoptotic (Bad) and antiapoptotic (Bcl-2) effect. In cultures of peritoneal cells of control and experimental groups multinucleated macrophages had differences in the degree of intensity of expression of apoptotic and antiapoptotic factors compared to a single core. In the cultures of experimental groups of macrophages were differences in the expression of apoptotic and antiapoptotic factors compared with the control. The decrease in the number binuclear and multinucleated macrophages with evidence of protein expression of Bcl-2 was observed in the 3-month observation period. For the same period of observation increased the number of expressing protein Bad multinuclear macrophages. These results indicate specific of the dynamics of the regulation of apoptosis in subpopulations of macrophages, varying by nuclear class, in terms of the BCG infection. In addition, various variants of localization of Bad and Bcl-2 proteins in the cytoplasm of macrophages, which were due to the specifics of the implementation of intracellular processes occurring in the cytoplasm of these cells, were described. These features should be taken into account when conducting cytological analysis of cell cultures containing macrophages differing in nuclear classes.

**Keywords:** multinucleated macrophages, apoptosis, proteins Bad and Bcl-2

Известно, что многоядерные клетки макрофагального происхождения участвуют в формировании гранулем [1; 2], имеющих значение в патогенезе туберкулезного гранулематоза [3]. Изучены различные аспекты образования гранулем при туберкулезном гранулематозе [3] и обсуждаются проблемы формирования [1; 4] и функционирования многоядерных макрофагальных производных [2; 4]. В то же время не вызывает сомнения тот факт, что численный состав популяции многоядерных макрофагов (МФ) обусловлен интенсивностью процессов формирования [1] и апоптоза данных кле-

ток [2]. В этой связи изучение проблемы апоптоза многоядерных МФ [2] представляет интерес в том плане, что с апоптозом связан механизм элиминации многоядерных клеток в очаге хронического воспаления [5] и это детерминирует изменение клеточного состава последнего.

Описана также динамика изменения клеточного состава БЦЖ-гранулем в процессе развития хронического гранулематозного воспаления [3]. Однако по-прежнему к категории малоизученных вопросов относится динамика реализации апоптоза многоядерных МФ в зависимости от характера

влияния проапоптогенных и антиапоптотических факторов, в том числе экспрессируемых самими многоядерными МФ, что обуславливает особенности развития процесса хронического воспаления при туберкулезном гранулематозе.

Далее следует указать, что кроме маркеров апоптоза, какими являются Caspasa-3 и белок p53 [6], экспрессия которых, несомненно, свидетельствует об его индукции [7], небезынтересна роль цитокинов в реализации процесса апоптоза [5; 8]. В частности, следует заметить, что TNF- $\alpha$  индуцирует процесс апоптоза МФ, в то время как IL-4 подавляет их апоптоз [5]. При этом TNF- $\alpha$  обладает весьма сложными функциями и его роль во многом остается малоизученной [9], однако показано его участие в регуляции апоптоза [10].

В то время как учет экспрессии белка Bcl-2 информативен в качестве метода оценки степени ингибирования апоптоза [7], поскольку Bcl-2 является антиапоптотическим фактором [11]. Изучение механизмов действия белков семейства Bcl-2 способствует пониманию их функций в регуляции процесса апоптоза [12]. Существует также Bcl-2-ассоциированный промоутер клеточной гибели белок Bad [13]. При этом известно, что наряду с белком Bad [12] некоторые другие протеины, в частности Bax [11; 12], Bak и Bik, относятся к промоутерам апоптоза [12]. Тем не менее именно белок Bad, причисляемый к Bcl-2-ассоциированным промоутерам клеточной гибели [13], заслуживает наибольшего внимания в плане совместной оценки интенсивности его экспрессии с протеином Bcl-2, детектирование которого, как уже было отмечено, информативно при определении степени ингибирования апоптоза [7].

В связи с вышеизложенным представляется целесообразным изучение аспектов реализации апоптоза многоядерных МФ, имеющих значение в развитии хронического туберкулезного гранулематозного воспаления, и уточнение роли многоядерных макрофагальных производных в экспрессии проапоптогенных и антиапоптотических факторов, обуславливающих степень интенсивности процесса апоптоза МФ, что определяет клеточный состав гранулем.

Целью работы являлось изучение в популяциях одноядерных и многоядерных МФ в первичных культурах перитонеальных клеток (ПК) интактных и БЦЖ-инфицированных мышей динамики экспрессии проапоптогенных (Bad) и антиапоптотических (Bcl-2) белков-регуляторов, обуславливающих специфику реализации апоптоза.

## Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили *in vitro* на клетках перитонеального трансудата мышей-самцов линии BALB/c возрастом 2 месяца. При реализации исследования использовали контрольную группу культур ПК, выделенных от интактных животных, и опытные группы культур ПК, выделенных от животных инфицированных микобактериями вакцины БЦЖ (МБ БЦЖ). Выведение животных из эксперимента осуществляли через 1 и 3 месяца после введения им вакцины БЦЖ. Причем на 3-месячный срок наблюдения отмечается формирование типичных БЦЖ-гранулем [3]. Вакцину БЦЖ вводили внутривентриально в дозе 0,5 мг в 0,25 мл изотонического водного раствора NaCl.

Суспензию ПК получали после выведения животных из эксперимента методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Инкубацию культур ПК ( $10^6$  клеток в 2 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов коров) проводили на покровных стеклах в течение 48 часов в пластиковых планшетах для культуральных исследований. Культуры ПК фиксировали 4% водным раствором формальдегида, приотвлеченным на фосфатном буфере.

При использовании методов световой микроскопии в культурах ПК оценивали частоту встречаемости клеток в субпопуляциях одноядерных, бинуклеарных и содержащих 3 и более ядер перитонеальных МФ. Цитологический анализ клеточных культур осуществляли при увеличении в 400 раз, используя микроскоп «AxioStar Plus» («Zeiss»). Поскольку (собираясь с целью настоящего исследования) была необходима оценка экспрессии проапоптотических и антиапоптотических белков, учитывали численный состав субпопуляций, различающихся по классам ядерности МФ, экспрессирующих соответствующие факторы. В ходе реализации иммуноцитохимических исследований определяли экспрессию у МФ проапоптогенных (Bad) и антиапоптотических (Bcl-2) белков-регуляторов непрямым иммуноцитохимическим методом с использованием системы визуализации на основе биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса «BD Pharmingen» Anti-Rat Ig HRP Detection Kit и диагностических наборов моноклональных антител «Novocastra». Проводили демаскировку исследуемых факторов 0,3% раствором Тритона X-100, приотвлеченным на фосфатном буфере. Иммуноцитохимическими признаками экспрессии у МФ белков Bad и Bcl-2 считали наличие окраски цитоплазмы в светло-коричневый цвет. При этом определяли долю МФ с указанными классами ядерности, обладающих признаками экспрессии отмеченных факторов.

При статистической обработке результатов анализа проводили оценку вероятности достоверности различий между сравниваемыми средними величинами при учете непараметрического критерия Манна – Уитни с использованием компьютерной программы «Statistica 8». Данные были представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). При этом различия между сравниваемыми средними величинами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Согласно результатам проведенного исследования в интактных культурах ПК

численность одноядерных МФ с признаками экспрессии белков Bcl-2 и Bad составляла около 1 %, тогда как у бинуклеарных и собственно многоядерных МФ экспрессия указанных факторов практически отсутствовала (табл. 1).

В культурах ПК экспериментальных групп динамика изменения показателя численности МФ, принадлежащих ко всем учитываемым классам ядерности, экспрессирующих антиапоптотический белок-регулятор Bcl-2, определялась снижением уровня данного параметра относительно месячного срока в культурах ПК, выделенных от животных, выведенных из эксперимента через 3 мес. от начала последнего, при этом максимальная частота встречаемости клеток с экспрессией фактора Bcl-2 была зарегистрирована в субпопуляции многоядерных МФ на сроки наблюдения 1 и 3 месяца (табл. 1).

Динамика изменения частоты встречаемости МФ с признаками экспрессии апоптотического фактора Bad характеризовалась тем, что количество бинуклеарных и многоядерных МФ, экспрессирующих Bad, относительно месячного срока возрастало на 3 мес. наблюдения (табл. 1). Кроме того, на указанный срок наблюде-

ния численность бинуклеарных и многоядерных МФ с экспрессией апоптотического фактора Bad значительно превышала количество клеток, экспрессирующих антиапоптотический белок-регулятор Bcl-2 (табл. 1).

Необходимо также отметить, что изменения уровней показателя численности МФ определялись прогрессивным увеличением частоты встречаемости их бинуклеарных и многоядерных форм в культурах ПК экспериментальных групп по сравнению с контролем, причем количество МФ, содержащих 3 и более ядер, увеличивалось в большей степени, чем численность бинуклеарных форм относительно контрольного уровня данных параметров (табл. 2).

Отмечаемое возрастание относительной численности бинуклеарных и собственно многоядерных МФ свидетельствовало о положительной динамике образования этих клеточных форм в условиях БЦЖ-инфицированности. Характер изменения величин показателей частоты встречаемости бинуклеарных и многоядерных МФ в культурах ПК экспериментальных групп определялся степенью напряженности процессов формирования и апоптоза макрофагальных производных.

Таблица 1

Доля МФ (%), экспрессирующих Bcl-2 и Bad, в культурах ПК мышей линии BALB/c ( $M \pm m$ )

Число ядер МФ	Срок после введения БЦЖ					
	Контроль		1 месяц		3 месяца	
	Исследуемый фактор		Исследуемый фактор		Исследуемый фактор	
	Bcl-2	Bad	Bcl-2	Bad	Bcl-2	Bad
1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	57,8 ± 3,4*	38,0 ± 3,7*	25,5 ± 3,0*●	41,8 ± 4,8*
2	0	0	55,6 ± 5,7*	52,9 ± 3,1*	20,0 ± 2,0*●	78,1 ± 3,4*●
3 и более	0	0	76,9 ± 8,0*	58,3 ± 6,0*	44,0 ± 4,0*●	89,5 ± 9,0*●

Примечания: все группы включали одинаковое количество ( $n = 6$ ) образцов культур ПК; \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ● $p < 0,05$  по сравнению со сроком наблюдения 1 мес.

Таблица 2

Доля бинуклеарных и многоядерных МФ (%) в культурах ПК мышей линии BALB/c ( $M \pm m$ )

Число ядер МФ	Срок после введения БЦЖ		
	Контроль	1 месяц	3 месяца
2	4,2 ± 0,4	5,3 ± 0,5	6,4 ± 0,5*
3 и более	0,8 ± 0,4	1,3 ± 0,5	2,4 ± 0,5*

Примечания: все группы включали одинаковое количество ( $n = 6$ ) образцов культур ПК; \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Это согласуется с фактами, указывающими на роль процессов мультинуклеации в формировании многоядерных МФ, реализующихся посредством amitotического деления ядер и клеточного слияния [4]. В этой связи хотелось бы уточнить, что роль amitotического деления ядер, весьма значимая в процессе мультинуклеации МФ в интактных клеточных культурах, существенно уступает таковой в культурах клеток, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных. В последнем случае первостепенное значение в формировании многоядерных МФ играет процесс клеточного слияния.

Из вышеизложенного следует, что бинуклеарные и многоядерные МФ имели большую интенсивность индукции процесса апоптоза по сравнению с одноядерными МФ в культурах ПК на все сроки ведения эксперимента. При этом в культурах ПК экспериментальных групп отмечалось изменение численности МФ, принадлежащих ко всем учитываемым классам ядерности, обладающих признаками экспрессии апоптотических и антиапоптотических факторов, степень резистентности к которым у МФ, вероятно, обусловлена их классом ядерности, детерминирующим структурно-функциональные особенности клеток. При этом снижение численности МФ, разнящихся по классам ядерности, с признаками экспрессии антиапоптотического фактора Bcl-2 и значительное возрастание количества экспрессирующих Bad бинуклеарных и многоядерных МФ регистрируется на 3-месячный срок наблюдения.

В то же время следует отметить, что процесс регуляции апоптоза МФ основан не только на действии белков-регуляторов Bad и Bcl-2, но также других факторов, включая некоторые цитокины. Кроме того, контроль численного состава субпопуляций МФ, разнящихся по классам ядерности, осуществляется как вследствие апоптоза этих клеток, так и в результате реакций мультинуклеации и, прежде всего, процессов клеточного слияния, обуславливающих формирование бинуклеарных и многоядерных МФ.

В частности, TNF- $\alpha$  является цитокином, инициирующим фузию МФ, детерминирующую формирование макрофагальных полинуклеаров, и индуцирующим апоптоз этих клеток. Тогда как IL-4 индуцирует реакции клеточного слияния МФ и ингибирует их апоптоз. При этом, на наш взгляд, стоит особо подчеркнуть, что TNF- $\alpha$  и IL-4 имеют значение именно в регуляции противоположно направленных по своей сущности процессов мультинуклеации и апоптоза МФ, обуславливающих количественный состав их субпопуляций. Немаловажно также,

что некоторые другие факторы, в частности GM-CSF, который обладает регуляторной функцией в отношении реакций клеточного слияния, определяющего процессы мультинуклеации МФ, также играют роль в контроле численности субпопуляции многоядерных МФ.

Кроме того, по нашему мнению для исследования проблемы апоптоза многоядерных МФ и проведения цитологического анализа этих клеток небезынтересно, что поскольку наблюдаются различия в структуре и функциях многоядерных клеток различных типов [4], то выделение уточняющих признаков, характеризующих клетки, требуется для адекватного проведения цитологического анализа.

В частности, распределение белков Bad и Bcl-2 в цитоплазме может обладать определенными особенностями. Возможно, существует зависимость локализации этих белков в цитоплазме клеток, которые разнятся по своим структурным и функциональным характеристикам, что может относиться также к МФ нескольких типов, причисляемых также к многоядерным производным этих клеток.

При проведении цитологического анализа культур перитонеальных МФ с применением методов иммуноцитохимического детектирования белков Bad и Bcl-2 в цитоплазме клеток было выделено несколько типов распределения этих белков в эндоплазме МФ, принадлежащих к различным классам ядерности. Регистрировали мононуклеарные и двуядерные МФ с преимущественной локализацией белков Bad и Bcl-2 в нескольких зонах периферической области эндоплазмы.

В клеточных культурах отмечали присутствие двуядерных МФ с локализацией белков Bad и Bcl-2 в одной зоне периферической области эндоплазмы и с локализацией этих белков вокруг ядер. Многоядерные МФ содержали белки Bad и Bcl-2 в межъядерной зоне, как и бинуклеарные МФ. Тогда как у МФ всех учитываемых классов ядерности регистрировали присутствие белков Bad и Bcl-2 также в зоне эндоплазмы, находящейся между центральной и периферической областью таковой.

Возможно, что вышеописанные варианты локализации в цитоплазме МФ белков Bad и Bcl-2 были детерминированы характером реализации внутриклеточных процессов, протекающих в соответствующих зонах эндоплазмы, что необходимо учитывать при проведении иммуноцитохимического анализа клеточных культур, содержащих МФ, разнящиеся по классам ядерности.

### Заключение

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о существовании различий в динамике экспрессии проапоптотических и антиапоптотических белков-регуляторов у МФ, класс ядерности которых обуславливает специфику реализации их апоптоза. При этом характер изменения численного состава субпопуляций многоядерных МФ был детерминирован не только интенсивностью процесса их апоптоза, но и напряженностью реакций мультинуклеации, на что указывала положительная динамика формирования данных макрофагальных производных в условиях БЦЖ-инфицированности. Изучение вышеизложенных аспектов представляется актуальным в плане создания перспективных методов цитологической диагностики и терапевтической коррекции гранулематозных заболеваний.

### Список литературы

1. Исследование *in vitro* экспрессии ИЛ-1 $\alpha$ , ГМКСФ и ФНО- $\alpha$  многоядерными макрофагами БЦЖ-инфицированных мышей / Д.А. Ильин [и др.] // Биол. эксперим. биол. мед. – 2013. – Т. 155. – № 5. – С. 615–618.
2. Исследование *in vitro* цитофизиологических характеристик многоядерных макрофагов от интактных и БЦЖ-инфицированных мышей / Д.А. Ильин [и др.] // Биол. эксперим. биол. мед. – 2015. – Т. 160. – № 11. – С. 617–621.
3. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия / В.А. Шкурупий. – М.: Изд-во РАМН, 2007. – 536 с.
4. Ильин Д.А. Многоядерные макрофаги / Д.А. Ильин. – Новосибирск: Наука, 2011. – 56 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. – Vol. 139. – № 2. – P. 90–100.
6. Kilari B.P., Kotakadi V.S., Penchalaneni J. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Basella rubra (L.) Against 1, 2-Dimethyl Hydrazine-induced Colon Carcinogenesis in Rats // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 73–80.
7. Rana S.V. Metals and apoptosis: recent developments // J. Trace. Elem. Med. Biol. – 2008. – Vol. 22. – № 4. – P. 262–284.
8. 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. – Vol. 67. – № 5–6. – P. 291–293.
9. Mootoo A., Stylianou E., Arias M.A., Reljic R. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2009. – Vol. 8. – № 1. – P. 53–62.
10. Ray J.C., Flynn J.L., Kirschner D.E. Synergy between individual TNF-dependent functions determines granuloma performance for controlling Mycobacterium tuberculosis infection // J. Immunol. – 2009. – Vol. 182. – № 6. – P. 3706–3717.
11. Saeedi Borujeni M.J., Hami J., Haghiri H., Rastin M., Sazegar G. Evaluation of Bax and Bcl-2 Proteins Expression in the Rat Hippocampus due to Childhood Febrile Seizure // Iran J. Child. Neurol. – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 53–60.
12. Reed J.C. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease // Behring Inst. Mitt. – 1996. – № 97. – P. 72–100.
13. Zhang H., Xiong Z., Wang J., Zhang S., Lei L., Yang L., Zhang Z. Glucagon-like peptide-1 protects cardiomyocytes from advanced oxidation protein product-induced apoptosis via the PI3K/Akt/Bad signaling pathway // Mol. Med. Rep. – 2016. – Vol. 13. – № 2. – P. 1593–1601.