

УДК 611.018

## ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ДИНАМИКИ ЭКСПРЕССИИ КАСПАЗЫ-3 И БЕЛКА P53 МНОГОЯДЕРНЫМИ МАКРОФАГАМИ БЦЖ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Ильин Д.А.

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

В субпопуляциях макрофагов в культурах перитонеальных клеток интактных и БЦЖ-инфицированных мышей линии BALB/c проводили изучение особенностей экспрессии маркеров апоптоза каспазы-3 и белка p53. В культурах перитонеальных клеток контрольной и экспериментальных групп многоядерные макрофаги обладали различиями в степени интенсивности реализации апоптоза по сравнению с одноядерными. В культурах экспериментальных групп макрофаги имели различную динамику экспрессии маркеров апоптоза, степень резистентности к которому была сопряжена с классом ядерности этих клеток. Характер экспрессии каспазы-3 и белка p53 свидетельствовал о том, что бинуклеарные и многоядерные макрофаги имели большую интенсивность индукции процесса апоптоза по сравнению с одноядерными на все сроки проведения эксперимента. Причем на 3 месяца наблюдения отмечалось снижение численности макрофагов с признаками экспрессии каспазы-3. Тогда как численность макрофагов с экспрессией p53 прогрессивно возрастала. Полученные данные свидетельствуют об особенностях динамики реализации апоптоза у субпопуляций многоядерных макрофагов, разнящихся по классам ядерности, в условиях БЦЖ-инфицированности. Исследование этих аспектов целесообразно, поскольку служит уточнению осуществления апоптоза у макрофагов, играющих значимую роль в патогенезе туберкулезного гранулематоза, вследствие того факта, что клетки макрофагального происхождения составляют основу гранулем.

**Ключевые слова:** клеточные культуры, иммуноцитохимический анализ, многоядерные макрофаги, апоптоз, каспаза-3, белок p53

## *IN VITRO* STUDY OF THE DYNAMICS OF EXPRESSION OF CASPASE-3 AND P53 PROTEIN BY 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*

In subpopulations of macrophages in cultures of peritoneal cells of intact and BCG-infected BALB/c mice the peculiarities of the expression of markers of apoptosis of caspase-3 and protein p53 were studied. In the cultures of peritoneal cells of the control and experimental groups multinucleated macrophages had differences in the degree of intensity of apoptosis compared with mononuclear ones. In the cultures of the experimental groups macrophages had different dynamics of expression of apoptosis markers the degree of resistance to which was associated with the class of nuclearity of these cells. The nature of the expression of caspase-3 and p53 protein indicated that binuclear and multinucleated macrophages had a greater intensity of induction of the apoptosis process compared to mononuclear ones for all the terms of the experiment. Moreover, for 3 months of observation there was a decrease in the number of macrophages with signs of caspase-3 expression. Whereas the number of macrophages with p53 expression progressively increased. The data obtained indicate the peculiarities of the dynamics of the realization of apoptosis in subpopulations of multinucleated macrophages differing in classes of nuclearity in conditions of BCG infection. The study of these aspects is advisable since it serves to clarify the implementation of apoptosis in macrophages that play a significant role in the pathogenesis of tuberculous granulomatosis due to the fact that cells of macrophage origin form the basis of granulomas.

**Keywords:** cell cultures, immunocytochemical analysis, multinucleated macrophages, apoptosis, caspase-3, protein p53

К настоящему моменту исследование многоядерных клеток различного происхождения получило свое развитие, нашедшее отражение в научной литературе [1–3]. При этом общеизвестно, что изучение многоядерных клеток является фундаментальной биологической проблемой, затрагивающей различные сферы медико-биологических наук. Одним из аспектов которой мы считаем исследование многоядерных макрофагов (МФ) [4, 5]. В частности, внимания заслуживает изучение вопросов

формирования, функционирования и апоптоза многоядерных МФ [4], играющих роль в патогенезе туберкулезного гранулематоза, по-прежнему остающегося весьма актуальной проблемой современной медицины [6]. Причем многоядерные макрофагальные производные вовлечены в процесс образования гранул [4] и исследована динамика изменения клеточного состава БЦЖ-гранулем [6].

Поскольку количественный состав субпопуляций бинуклеарных и многоядерных

МФ, различающихся по своим структурным и функциональным характеристикам, детерминирован активностью процессов их образования и апоптоза и с последним сопряжен механизм элиминации многоядерных МФ в гранулемах, то актуальным является исследование специфики реализации апоптоза у различающихся по классам ядерности МФ, играющих роль в развитии хронического туберкулезного гранулематоза.

Отмечая несомненную актуальность исследования проблемы апоптоза [7–9], следует указать, что его реализация протекает при контролирующем влиянии белков – регуляторов апоптоза. В частности, можно назвать белки Вах и Bcl-2 [10]. В то же время маркерами апоптоза являются каспаза-3 и белок p53 [9], идентифицируемые методами иммуногистохимического анализа [7], характер экспрессии которых свидетельствует об индукции этого процесса, по-прежнему остающегося малоизученным аспектом проблемы многоядерных МФ при туберкулезном гранулематозе.

Цель работы – изучить среди мононуклеарных, двуядерных и мультиядерных МФ в культурах перитонеальных клеток (ПК) интактных и БЦЖ-инфицированных мышей динамики экспрессии маркеров апоптоза: каспазы-3 и белка p53, в качестве факторов, продукция которых свидетельствует об индукции апоптоза у МФ.

#### **Материалы и методы исследования**

Материалом для исследования являлся перитонеальный трансудат мышей линии BALB/c. Цитологическому анализу подвергались МФ данного трансудата, обладающие различным содержанием ядер в них. Были использованы контрольная и опытные группы клеточных культур. Контрольную группу составляли клеточные культуры ПК, которые были выделены от интактных мышей. Экспериментальные группы культур выделяли от мышей, инфицированных микобактериями вакцины БЦЖ. Учет параметров при цитологическом анализе культур клеток проводили через 1, 2, 3 мес. после инфицирования мышей микобактериями из вакцины БЦЖ, которую вводили внутривентрально. Используемая доза на одну мышью составляла 0,5 мг в 0,25 мл физиологического раствора.

Мышей выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом [5]. Выделение клеточной взвеси проводили из брюшной полости животных. Культивирование клеточных культур, содержащих  $10^6$  ПК в 2 мл

среды 199, реализовывали на покровных стеклах. Время инкубации культур ПК составляло 48 ч с использованием термостата при 37 °С. По завершении инкубации клеточных культур их фиксировали водным раствором формальдегида.

Для цитологического анализа культур был применен метод световой микроскопии при 400-кратном увеличении. Определяли относительную численность МФ, содержащих одно, два, три и более ядер. Оценку продукции МФ каспазы-3 и белка p53 осуществляли путем иммуноцитохимического анализа с использованием диагностических наборов моноклональных антител. В качестве признаков продукции МФ вышеуказанных белков учитывали их окраску в светло-коричневый цвет.

Анализ статистических параметров проводился на компьютерной программе «Statistica 8». Учитывали достоверность различий между сравниваемыми средними величинами с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Полученные данные статистического анализа представляли как среднюю арифметическую и ошибку средней. Различия между средними величинами параметров принимали как достоверные при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

По мнению автора, прежде всего, необходимо отметить, что согласно результатам проведенного исследования в интактных культурах ПК было зарегистрировано минимальное количество одноядерных МФ с признаками экспрессии маркера апоптоза каспазы-3 в цитоплазме данных клеток при практическом отсутствии таковой у бинуклеарных и многоядерных МФ (табл. 1).

Далее требуется привести тот несомненный факт, что в культурах ПК экспериментальных групп по сравнению с интактным контролем отмечали многократное возрастание на все сроки наблюдения относительной численности МФ, принадлежащих ко всем учитываемым при проведении эксперимента классам ядерности, с иммуноцитохимическими признаками продукции такого фактора, как каспаза-3, безусловно указывающими на реализацию процесса апоптоза МФ (табл. 1).

Максимальная частота встречаемости одноядерных, бинуклеарных и многоядерных МФ, экспрессирующих каспазу-3, была зарегистрирована в группе культур ПК, выделенных от животных, выведенных из эксперимента через 1 мес. после введения им вакцины БЦЖ (табл. 1).

Таблица 1

Доля одноядерных и многоядерных МФ (%), экспрессирующих каспазу-3, в культурах ПК мышей линии BALB/c (M<sub>±</sub>m), n = 6

| Количество ядер | Интактные            | 1 мес. после введения БЦЖ | 2 мес. после введения БЦЖ | 3 мес. после введения БЦЖ |
|-----------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1               | 1,0 <sub>±</sub> 0,1 | 41,0 <sub>±</sub> 2,4*    | 35,3 <sub>±</sub> 1,0*♦   | 8,5 <sub>±</sub> 1,0*♦    |
| 2               | 0                    | 60,0 <sub>±</sub> 4,3*    | 49,0 <sub>±</sub> 3,7*♦   | 20,0 <sub>±</sub> 2,0*♦   |
| 3 и >           | 0                    | 66,7 <sub>±</sub> 7,0*    | 48,9 <sub>±</sub> 6,0*♦   | 19,5 <sub>±</sub> 2,0*♦   |

Примечание: \*p < 0,05 по сравнению с контролем; ♦p < 0,05 по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

Таблица 2

Доля одноядерных и многоядерных МФ (%), экспрессирующих белок p53, в культурах ПК мышей линии BALB/c (M<sub>±</sub>m), n = 6

| Количество ядер | Интактные            | 1 мес. после введения БЦЖ | 2 мес. после введения БЦЖ | 3 мес. после введения БЦЖ |
|-----------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1               | 0,4 <sub>±</sub> 0,1 | 5,0 <sub>±</sub> 0,8*     | 13,8 <sub>±</sub> 1,0*♦   | 19,3 <sub>±</sub> 2,0*♦   |
| 2               | 1,0 <sub>±</sub> 0,1 | 14,3 <sub>±</sub> 2,5*    | 22,4 <sub>±</sub> 2,0*♦   | 26,0 <sub>±</sub> 2,5*    |
| 3 и >           | 0                    | 8,0 <sub>±</sub> 1,0*     | 27,3 <sub>±</sub> 3,0*♦   | 35,0 <sub>±</sub> 4,0*    |

Примечание: \*p < 0,05 по сравнению с контролем; ♦p < 0,05 по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

При этом относительная численность многоядерных МФ с признаками экспрессии каспазы-3 превосходила таковую у одноядерных и бинуклеарных форм МФ, присутствующих в культурах ПК данной группы (табл. 1). Культуры ПК, выделенных от животных, выведенных из эксперимента на последующие сроки (2 и 3 мес.) наблюдения, характеризовались прогрессивным уменьшением частоты встречаемости МФ, экспрессирующих каспазу-3 (табл. 1). При этом численность бинуклеарных и многоядерных МФ с признаками экспрессии каспазы-3 по-прежнему превосходила по этому показателю одноядерные МФ (табл. 1).

В то же время в отношении динамики изменения уровня показателя частоты встречаемости МФ с признаками экспрессии белка p53 в культурах ПК экспериментальных групп наблюдалась иная тенденция. Можно заметить, что численность экспрессирующих белок p53 МФ, принадлежащих ко всем учитываемым классам ядерности, в культурах ПК, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных, в соответствии со сроками их выведения из эксперимента прогрессивно возрастала относительно контроля, характеризующегося минимальным уровнем частоты встречаемости МФ, имеющих экспрессию p53 в ядрах (табл. 2).

В частности, максимальная степень увеличения численности клеток с признаками

экспрессии белка p53 была характерна для дву- и многоядерных МФ (табл. 2). Причем в культурах ПК, выделенных от животных, выведенных из эксперимента через 1 мес. после его начала, наибольшая частота встречаемости клеток, экспрессирующих белок p53, отмечалась в субпопуляции бинуклеарных МФ (табл. 2). Однако при увеличении сроков наблюдения относительная численность многоядерных МФ с экспрессией этого фактора превосходила уровень аналогичного параметра у бинуклеарных и в большей степени у одноядерных МФ (табл. 2).

Здесь необходимо заметить, что в отличие от белка p53 действие каспазы-3 носит необратимый характер, и поэтому детектирование последней является более информативным параметром оценки интенсивности реализации апоптоза. Указанные различия в динамике экспрессии каспазы-3 и белка p53, по-видимому, были обусловлены особенностями экспрессии белков – регуляторов апоптоза и продукции индуцирующих этот процесс медиаторов и, кроме того, степенью резистентности отдельных субпопуляций МФ к влиянию этих факторов.

Далее следует провести сравнительный анализ данных, свидетельствующих о степени интенсивности индукции апоптоза у МФ и взаимно сопоставить особенности экспрессии у МФ каспазы-3 и белка p53.

Итак, представляется возможным утверждать следующее. В культурах ПК, выделенных от животных через 1 мес. после их инфицирования вакциной БЦЖ, отмечали, что средняя суммарная частота встречаемости одноядерных МФ, экспрессирующих такие маркеры апоптоза, как каспаза-3 и белок p53, существенно уступала аналогичному параметру у бинуклеарных и многоядерных МФ (табл. 1 и 2).

В культурах ПК, выделенных от животных через 2 мес. от начала эксперимента, зарегистрировано увеличение численности МФ, имеющих иммуноцитохимические признаки экспрессии маркера апоптоза белка p53, что было справедливо в отношении МФ, принадлежащих ко всем учитываемым классам ядерности, но в то же время отмечено некоторое уменьшение количества одноядерных, бинуклеарных и многоядерных МФ, экспрессирующих каспазу-3 (табл. 1 и 2).

В культурах ПК, выделенных от животных через 3 мес. после их инфицирования вакциной БЦЖ, количество имеющих различные классы ядерности МФ с признаками апоптоза значительно уменьшалось. Это преимущественно происходило за счет снижения числа МФ, экспрессирующих каспазу-3, несмотря на некоторое увеличение доли клеток с признаками экспрессии белка p53 по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (табл. 1 и 2). Данный феномен был, возможно, обусловлен снижением степени продукции апоптотических медиаторов МФ. В то же время относительная численность бинуклеарных и многоядерных МФ в состоянии апоптоза превосходила таковую у одноядерных МФ.

Обсуждая актуальные вопросы апоптоза многоядерных МФ, требуется также упомянуть о том, что при реализации цитологического анализа клеток с признаками апоптоза необходимо учитывать особенности экспрессии каспазы-3 и белка p53. По нашему мнению, не исключено, что МФ, различающиеся по своим структурным и функциональным характеристикам и принадлежащие к различным классам ядерности, несомненно, имеют определенную специфику экспрессии каспазы-3 и белка p53.

Вследствие реализации иммуноцитохимического анализа клеточных культур у МФ выявлялась продукция каспазы-3. В этой связи хотелось бы заметить, что нами выделено несколько различных типов распределения каспазы-3 в эндоплазме МФ, причисленных к неаналогичным классам ядерности. Так, регистрировали одноядерные, бинуклеарные и собственно многоядерные МФ (содержащие три и более ядер) с преимущественной локализацией каспа-

зы-3 в отдельных зонах эндоплазмы. Встречались бинуклеарные МФ с локализацией каспазы-3 в одной из зон периферической области эндоплазмы и (или) с локализацией этих белков вокруг ядер. Бинуклеарные и собственно многоядерные МФ нередко содержали каспазу-3 в межъядерной зоне цитоплазмы. Кроме того, экспрессия белка p53 у бинуклеарных и многоядерных МФ иногда отмечалась не во всех ядрах у клеток с признаками апоптоза.

Указанные варианты локализации в цитоплазме МФ каспазы-3 и экспрессии в их ядрах белка p53, возможно, были обусловлены спецификой осуществления апоптоза у МФ, различающихся по классам ядерности и иным структурно-функциональным характеристикам, что требуется учитывать при иммуноцитохимическом анализе клеточных культур. Например, изучение этих аспектов окажется полезным в плане постижения особенностей реализации апоптоза у МФ и, в частности, регуляции у них экспрессии ядерных и цитоплазматических факторов, что, безусловно, потребует проведения специальных исследований, затрагивающих вопросы индукции и ингибирования апоптоза посредством проапоптотических и антиапоптотических белков – регуляторов данного процесса.

В завершение обсуждения вышеуказанных аспектов следует отметить, что изменения уровней показателя численности МФ характеризовались прогрессивным увеличением частоты встречаемости их бинуклеарных и многоядерных форм в культурах ПК экспериментальных групп по сравнению с контролем. Например, в соответствии с результатами проведенного исследования в культурах ПК экспериментальной группы на 3 мес. наблюдения (период формирования типичных гранулем) относительно контроля зарегистрировано максимальное увеличение численности (по сравнению с другими сроками наблюдения) двуядерных МФ на 41,7 % и полинуклеарных МФ в 4,6 раза.

Согласно мнению автора специфика изменения уровней параметров численности двуядерных, а также мультинуклеарных МФ в клеточных культурах экспериментальных групп связана с интенсивностью процессов мультинуклеации и апоптоза макрофагальных производных. Увеличение количества МФ по сравнению с интактным контролем свидетельствовало о динамике образования указанных клеточных форм в условиях БЦЖ-инфицированности животных. Это указывало на роль процессов мультинуклеации в формировании многоядерных МФ. Оно реализуется посредством

амитотического деления ядер и клеточного слияния [4]. Причем если в физиологических условиях наибольшее значение в мультинуклеации МФ принадлежит амитотическому делению их ядер, то при действии гранулемогенных агентов ведущую роль в формировании многоядерных МФ играет клеточное слияние.

В соответствии с приведенным выше мнением как бинуклеарные, так и мультинуклеарные МФ обладали высокой интенсивностью индукции апоптоза в сопоставлении с одноядерными МФ в клеточных культурах на все сроки проведения эксперимента. В культурах ПК снижалась численность МФ всех классов ядерности с признаками экспрессии каспазы-3 на 3 мес. наблюдения, что является в данном случае более информативным показателем активности апоптоза МФ. Различия по классам ядерности МФ имели различную динамику интенсивности индукции апоптоза, поскольку уровень устойчивости к действию про- и антиапоптотическим факторам у МФ характеризовалась их классом ядерности, предопределяющим морфофункциональные особенности данных гистиоцитарных клеток.

### Заключение

В завершение обсуждения комплекса вышеизложенных аспектов хотелось бы заметить, что наблюдаются очевидные различия в характере динамики экспрессии маркеров апоптоза у МФ, класс ядерности которых предопределяет специфику реализации их апоптоза. Тогда как характер изменения количественного состава популяций многоядерных МФ, по всей видимости, детерминируется интенсивностью процесса их апоптоза и напряженностью реакций мультинуклеации, на что указывала позитивная динамика формирования данных гистиоцитарных форм в условиях БЦЖ-инфицированности. Требуется также учесть, что при изучении аспектов апоптоза многоядерных МФ и реализации цитологического анализа культур, содержащих упомянутые клетки, немаловажен факт присутствия определенных различий в структуре этих полинуклеаров. Поэтому детектирование ряда признаков, например характере

ра распределения каспазы-3 в цитоплазме многоядерных МФ и особенностей экспрессии белка p53 в их ядрах служит оптимизации цитологического анализа культур ПК, что должно содействовать повышению достоверности проводимого исследования. Изучение изложенных аспектов актуально в перспективе разработки современных технологий цитологической диагностики и создания эффективных способов терапевтической коррекции туберкулезного гранулематоза, имеющих своей целью соответственно прогнозирование его развития и выбор клеток-мишеней при индукции их апоптоза для терапевтической коррекции этого заболевания.

### Список литературы

1. 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. *Toxicol. Ind. Health*. 2018. V. 34. № 7. P. 449–457.
2. 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 Cytol.* 2017. V. 61. № 2. P. 160–164.
3. 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. *Chin J. Dent. Res.* 2017. V. 20. № 2. P. 105–109.
4. Ильин Д.А. Многоядерные макрофаги. Новосибирск: Наука, 2011. 56 с.
5. Ильин Д.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С. Исследование *in vitro* экспрессии рецепторов CD1, CD14, CD25, CD30, CD35, CD95 макрофагами мышей, инфицированных микобактериями туберкулёза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172. № 7. С. 52–55.
6. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М., Изд-во РАМН, 2007. 536 с.
7. Noble P., Vyas M., Al-Attar A., Durrant S., Scholefield J., Durrant L. High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival. *Br. J. Cancer*. 2013. V. 108. № 10. P. 2097–2105.
8. Haoues M., Refai A., Mallavialle A., Barbouche M.R., Laabidi N., Deckert M., Essafi M. Forkhead box O3 (FOXO3) transcription factor mediates apoptosis in BCG-infected macrophages. *Cell. Microbiol.* 2014. V. 16. № 9. P. 1378–1390.
9. 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. V. 17. № 1. P. 73–80.
10. 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. V. 10. № 1. P. 53–60.