

УДК 611.018

**РОЛЬ РАЗНЯЩИХСЯ ПО КЛАССАМ ЯДЕРНОСТИ  
ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ  
БЦЖ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ  
ЛИНИИ BALB/C В ЭКСПРЕССИИ CD11, CD14, CD25,  
CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, bFGF, CATD, MMP-1**

**Ильин Д.А.***НИИ экспериментальной и клинической медицины**ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,  
Новосибирск, e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru*

Многоядерные макрофаги (МФ) участвуют в развитии патологических процессов, в том числе в патогенезе туберкулезного гранулематоза, являющегося в достаточной степени актуальной проблемой. ПолинуCLEARные гистиоциты имеют высокий функциональный потенциал, что позволяет им быть активными участниками гранулемогенеза. Основная субпопуляция многоядерных гистиоцитов представлена бинуклеарными макрофагальными формами, что обуславливает актуальность их изучения. Кроме того, бинуклеарные МФ являются предшественниками собственно многоядерных и гигантских полинуCLEARных гистиоцитов, которые непосредственно участвуют в формировании гранулем и детерминируют характер их развития. Заметим также, что макрофагальные клетки, включая их бинуклеарные формы, характеризуются экспрессией ряда молекул клеточной поверхности, продукцией цитокинов и гидролитических ферментов. Эти белки обеспечивают участие МФ соответственно в процессах клеточной мультинуCLEARации, гранулемогенезе, фиброзе тканей органов и обуславливают высокий гидролитический потенциал, являющийся причиной некроза тканей. Поэтому при проведении исследования учитывали экспрессию CD11, CD14, CD25, CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, bFGF, CatD, MMP-1 МФ, в том числе их бинуклеарными производными в культурах перитонеальных клеток (ПК) интактных и БЦЖ-инфицированных мышей линии BALB/c. Согласно результатам исследования в культурах ПК экспериментальной группы МФ обычно имели более высокий потенциал в отношении экспрессии ряда CD рецепторов, цитокинов и гидролитических ферментов по сравнению с контролем. Кроме того, мы отмечали некоторые различия в экспрессии этих белков МФ, разнящимися по классам ядерности. Продолжение этих исследований целесообразно в смысле постижения значения гистиоцитов в реализации патогенеза туберкулезного гранулематоза.

**Ключевые слова:** макрофаги, CD рецепторы, цитокины, гидролитические ферменты, туберкулезный гранулематоз

**THE ROLE OF PERITONEAL MACROPHAGES  
OF BCG-INFECTED BALB/C MICE DIFFERING  
IN NUCLEAR CLASSES IN EXPRESSION CD11, CD14,  
CD25, CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, bFGF, CATD, MMP-1**

**Ilin D.A.***Research Institute of Experimental and Clinical Medicine  
of FSBRI the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine,  
Novosibirsk, e-mail: ilindenis.ilin@yandex.ru*

Multinucleated macrophages (MF) are involved in the development of pathological processes, including the pathogenesis of tuberculous granulomatosis, which is a sufficiently urgent problem. Polynuclear histiocytes have a high functional potential, which allows them to be active participants in granulomogenesis. The main subpopulation of multinucleated histiocytes is represented by binuclear macrophage forms, which determines the relevance of their study. In addition, binuclear MF are the precursors of the actual multinuclear and giant polynuclear histiocytes, which are directly involved in the formation of granulomas and determine the nature of their development. It should also be noted that macrophage cells, including their binuclear forms, are characterized by the expression of a number of cell surface molecules, the production of cytokines and hydrolytic enzymes. These proteins ensure the participation of MF, respectively, in the processes of cellular multinucleation, granulomogenesis, fibrosis of organ tissues and cause a high hydrolytic potential, which is the cause of tissue necrosis. Therefore, the study took into account the expression of CD11, CD14, CD25, CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, bFGF, CatD, MMP-1 MF, including their binuclear derivatives in cultures of peritoneal cells (PC) of intact and BCG-infected BALB/c mice. According to the results of the study, in the PC cultures of the experimental group, MF usually had a higher potential for the expression of a number of CD receptors, cytokines and hydrolytic enzymes compared with the control. In addition, we noted some differences in the expression of these MF proteins, differing by nuclear classes. The continuation of these studies is advisable in the sense of understanding the importance of histiocytes in the implementation of the pathogenesis of tuberculous granulomatosis.

**Keywords:** macrophages, CD receptors, cytokines, hydrolytic enzymes, tuberculous granulomatosis

Известно, что фундаментальная биологическая проблема многоядерных клеток имеет различные аспекты своего изучения

[1]. Например, необходимо понимание особенностей развития процессов образования многоядерных клеток, их строения и по-

ведения в ходе реализации физиологических, а также патологических процессов. Внимания заслуживают вопросы методологии изучения и классифицирования мультиядерных клеток.

Многоядерные клетки, конечно, могут иметь как неидентичный генез, так и морфофункциональные характеристики и, вне всякого сомнения, отличаться по характеру своего участия в развитии компенсаторно-приспособительных процессов и вовлечения в патогенез разнящихся по этиологии заболеваний. Для удобства рассмотрения проблемы требуется, по мнению автора, выделять макрофагальное, а также и немакрофагальное происхождение клеток, что объясняется наличием многочисленных гистиоцитарных дериватов, составляющих длинный ряд клеток различных видов, которые, несомненно, обладают неидентичными морфологическими и функциональными особенностями, в связи с чем имеют весьма различное назначение в плане развития цитофизиологических и патологических процессов. Методологическая проблема изучения многоядерных клеточных производных базируется, на наш взгляд, на вычлениении унифицированных подходов в процессе исследования этих клеток. Необходимо также учитывать реальную потребность в единой терминологической базе рассмотрения означенной проблемы.

Кроме того, имеются достаточно редко рассматриваемые вопросы настоящей темы. В частности, следует упомянуть о редких типах полинуклеаров, а также о комбинированных процессах образования многоядерных клеточных производных и, кроме этого, о феноменах развития гибридных поликарионов и об образовании в достаточной степени небезынтересных надклеточных формирований. Например, можно сказать о синцитиях и симпластах и об участии полинуклеарных клеток в процессах, приводящих к их образованию.

В научной литературе отмечено несомненное существование феномена многоядерных клеток [1–3]. При этом наличие макрофагальных полинуклеаров представляет, по нашему мнению, значительный интерес, поскольку многоядерные макрофагальные производные, составляя существенное звено проблемы полинуклеаров ввиду многочисленности типов многоядерных гистиоцитарных форм, играют важнейшую роль в реализации патологических процессов [1]. В частности, многоядерные МФ участвуют в патогенезе гранулематозных заболеваний – сложной социально-экономической проблеме.

Причем туберкулезный гранулематоз, представляя собой актуальную проблему медицины вследствие его распространенности и последствий его существования, является социально значимым заболеванием. В основе развития туберкулезного гранулематоза лежит феномен формирования гранулем, значимыми участниками образования которых являются клетки макрофагального происхождения.

Среди МФ особенно выделяются гистиоцитарные полинуклеары, в том числе гигантские многоядерные клетки макрофагального генеза, обладающие высоким функциональным потенциалом, способствующим реализации их значимой роли в развитии патологических процессов [1]. Достаточно многочисленной субпопуляцией среди многоядерных гистиоцитов являются бинуклеарные макрофагальные производные, которые, вероятно, относятся к предшественникам полинуклеарных МФ [1]. Данные обстоятельства, а также то, что бинуклеарные МФ остаются сравнительно малоизученной субпопуляцией гистиоцитов, обуславливает актуальность их исследования.

В этой связи интерес, в частности, представляет роль бинуклеарных МФ в патогенезе туберкулезного гранулематоза. Несомненно, что большое значение в нем имеют процессы мультиядерности и активации МФ, способствующие гранулемогенезу, а также их участия в развитии фиброза и некроза тканей различных органов. Поэтому следует указать, что в основе мультиядерности МФ в патологических условиях лежит процесс клеточной фузии, обеспечиваемой посредством молекул клеточной адгезии при контролирующем влиянии медиаторов [1]. При этом известно, что в процессах клеточной мультиядерности принимают участие фузогенные медиаторы и молекулы клеточной поверхности [1]. Кроме того, небезынтересна роль активационных CD рецепторов в инициации комплекса клеточных функций у МФ в ответ на присутствие них *M. tuberculosis*.

Иной аспект рассматриваемой проблемы заключается в следующей ее особенности. В патогенезе туберкулезного гранулематоза важна роль образования казеозного некроза [4] и фибрирования тканей органов [5]. Поэтому исследование формирования некроза [4], а также участия профиброзных [6] и противифиброзных факторов [7] в регуляции процессов фибрирования тканей представляется актуальной задачей. Отмечая значение профиброзных цитокинов [6; 8] и протеолитических ферментов,

вовлеченных в развитие упомянутых процессов, можно упомянуть, в частности, о том, что матриксные металлопротеиназы обладают протеолитическим эффектом [9; 10] и детерминируют деструкцию ткани, определяя значительное разрушение коллагена, влекущее развитие казеозного некроза. Это также справедливо в отношении катепсинов, роль которых в этих процессах исследована, вероятно, в меньшей степени.

Изучение экспрессии упомянутых факторов и молекул клеточной поверхности целесообразно в смысле постижения аспектов патогенеза туберкулезного гранулематоза. Это верно в отношении многоядерных МФ, входящих в состав туберкулезных гранул и обладающих высоким уровнем функциональной активности в плане экспрессии различных факторов, контролирующих мультинуклеацию МФ, гранулемогенез, процессы фиброобразования и деструкции тканей органов, что характерно для туберкулезного гранулематоза и имеет большое значение для исследования его патогенеза.

Изучение вышеизложенных аспектов полезно с точки зрения понимания патогенеза туберкулезного гранулематоза, что важно для разработки перспективных методов диагностики такового, прогнозирования развития его осложнений и при выборе клеточ-мишеней, используемых при терапевтической коррекции гранулематозных заболеваний.

Цель исследования – в культурах ПК, выделенных от интактных и БЦЖ-инфицированных мышей, изучить характер экспрессии моно- и бинуклеарными МФ ряда CD рецепторов, цитокинов и гидролитических ферментов, обеспечивающих реализацию соответственно процессов мультинуклеации МФ и их активации, а также участия МФ в фиброобразовании и некрозе тканей органов.

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

Эксперимент проводили на культурах ПК, выделенных от интактных (контрольная группа) и БЦЖ-инфицированных (экспериментальная группа) мышей-самцов линии BALB/c. Мышам проводили внутрибрюшинное введение вакцины БЦЖ в дозе 0,5 мг [2]. Выведение мышей из эксперимента было реализовано методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом через 3 месяца после введения им вакцины БЦЖ [2]. Культивирование ПК осуществляли в среде 199 в течение 48 ч при 37 °С в планшетах для культуральных исследований.

Анализ цитологических препаратов культур ПК проводили методами световой микроскопии. Определяли показатели относительной численности моно- и бинуклеарных МФ с признаками экспрессии детектируемых белков, принимая за 100% количество МФ в пределах каждого класса ядерности. Иммуноцитохимический анализ проводили непрямым иммуноцитохимическим методом с использованием диагностических наборов моноклональных антител, оценивая у МФ признаки экспрессии CD11, CD14, CD25, CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, bFGF, CatD, MMP-1. При статистическом исследовании данных, полученных в ходе проведенного эксперимента, осуществляли анализ показателей средней арифметической и стандартной ошибки средней. В качестве достоверных был проведен учет различий между сравниваемыми средними величинами при  $p < 0,05$ .

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

В культурах ПК контрольной группы бинуклеарные МФ зачастую имели более высокий уровень функциональной активности, чем мононуклеарные МФ, что выражалось в интенсивной экспрессии некоторых CD рецепторов и продукции отдельных цитокинов и гидролитических ферментов (таблица).

В частности, можно отметить, что относительная численность бинуклеарных МФ с признаками экспрессии CD 14, GM-CSF, MMP-1 превосходила, а с экспрессией CD 36 и bFGF значительно превышала уровни соответствующих параметров у мононуклеарных МФ (таблица). Исключение составляли бинуклеарные МФ по показателям экспрессии TNF- $\alpha$  и CatD (таблица). Кроме того, отсутствовали достоверные различия по уровням параметров частоты встречаемости моно- и бинуклеарных МФ с экспрессией CD 11, CD 25 и IL-1 (таблица).

В то же время в культурах ПК экспериментальной группы относительная численность бинуклеарных МФ с признаками экспрессии CD 36 существенно, а с экспрессией CD 11, GM-CSF, TNF- $\alpha$  значительно превышала уровни соответствующих показателей у одноядерных МФ (таблица). По остальным учитываемым параметрам достоверных различий не наблюдалось за исключением численности бинуклеарных МФ с экспрессией CatD, поскольку значение данного показателя у двуядерных МФ уступало таковому у мононуклеарных МФ (таблица).

Относительная численность одноядерных и бинуклеарных МФ (%) с экспрессией CD11, CD14, CD25, CD36, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CatD, MMP-1, IL-1, bFGF в культурах ПК

Показатель	Интактные мыши		БЦЖ-инфицированные мыши	
	Субпопуляции МФ		Субпопуляции МФ	
	Мононуклеарные МФ	Бинуклеарные МФ	Мононуклеарные МФ	Бинуклеарные МФ
CD11	1,0 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	45,0 $\pm$ 3,0*	70,0 $\pm$ 5,7*●
CD14	72,8 $\pm$ 3,0	84,7 $\pm$ 1,7●	94,0 $\pm$ 1,5*	96,5 $\pm$ 2,0*
CD25	22,5 $\pm$ 2,6	32,0 $\pm$ 3,0	92,0 $\pm$ 2,0*	84,0 $\pm$ 3,0*
CD36	4,0 $\pm$ 1,0	19,0 $\pm$ 1,0●	56,0 $\pm$ 3,0*	75,0 $\pm$ 5,0*●
GM-CSF	4,7 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,6●	23,0 $\pm$ 2,0*	38,0 $\pm$ 3,0*●
TNF- $\alpha$	2,0 $\pm$ 0,2	0●	11,0 $\pm$ 1,0*	31,6 $\pm$ 3,0*●
CatD	77,5 $\pm$ 2,6	65,9 $\pm$ 1,0●	91,0 $\pm$ 2,0*	72,0 $\pm$ 7,0●
MMP-1	32,0 $\pm$ 2,9	48,0 $\pm$ 5,0●	88,0 $\pm$ 2,0*	84,0 $\pm$ 5,0*
IL-1	4,2 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,4*	9,3 $\pm$ 1,0*
bFGF	16,0 $\pm$ 2,0	48,0 $\pm$ 3,0●	95,0 $\pm$ 1,0*	95,0 $\pm$ 4,0*

Примечание. Каждая группа включала одинаковое количество (n) образцов культур ПК (n = 6); \*p < 0,05 в сравнении с контролем; ●p < 0,05 в сравнении с одноядерными МФ в одной группе.

Тогда как при проведении межгруппового сравнения результатов исследования можно отметить следующие факты. Прежде всего, наблюдалось достоверное увеличение частоты встречаемости моно- и бинуклеарных МФ с признаками экспрессии учитываемых в исследовании CD рецепторов, цитокинов и гидролитических ферментов в культурах ПК экспериментальной группы по сравнению с контролем (таблица). Исключение составляли бинуклеарные МФ с экспрессией CatD (таблица). Нередко возрастание уровней показателей можно было охарактеризовать как значительное, неоднократное и в некоторых случаях многократное. Итак, среди мононуклеарных МФ в культурах ПК экспериментальной группы зарегистрировано многократное возрастание числа клеток с экспрессией CD 11, CD 36, GM-CSF, TNF- $\alpha$  (таблица). Кроме того, неоднократно увеличивалось число мононуклеарных МФ с признаками экспрессии CD 25, MMP-1, bFGF (таблица). Существенное увеличение количества мононуклеарных МФ отмечалось с экспрессией CD 14, CatD, IL-1 (таблица).

В отношении бинуклеарных МФ в культурах ПК экспериментальной группы можно заметить, что по сравнению с контролем многократно увеличивалось количество клеток с экспрессией CD 11, GM-CSF, TNF- $\alpha$  (таблица). Неоднократно возрастала численность двуядерных МФ, экспрессирующих CD 25, CD 36, IL-1 (таблица). Значи-

тельно интенсифицировалась экспрессия CD 14, MMP-1, bFGF у бинуклеарных МФ (таблица).

Из вышеизложенной информации логически следует вывод о несомненном существовании различий в реализации процессов экспрессии ряда CD рецепторов, а также продукции отдельных цитокинов и гидролитических ферментов мононуклеарными и двуядерными МФ в условиях интактной культуры ПК и в культурах ПК, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных.

Причем в интактных культурах ПК среди МФ, принадлежащих к одноядерным и бинуклеарным, превалировали клетки с иммуноцитохимическими признаками экспрессии CD 14 (таблица), обуславливающего клеточную активацию. Кроме того, высокая частота встречаемости моно- и бинуклеарных МФ с экспрессией CatD (таблица), на наш взгляд, свидетельствовала о значительной потенциальной роли этих гистиоцитарных клеток в процессе некроза тканей.

При этом бинуклеарные МФ лидировали по интенсивности экспрессии CD 36 и bFGF по сравнению с мононуклеарными (таблица), что говорит о функции первых в обусловленных действием указанных белков процессах. В культурах ПК экспериментальной группы степень интенсивности экспрессии у МФ CD 11 и CD 36, непосредственно участвующих в реализации процесса слияния МФ, была сопоста-

вима ввиду многократно возросшей активности экспрессии CD 11 у МФ (таблица). Многократно увеличивалась и интенсивность экспрессии фузогенных цитокинов (GM-CSF и TNF- $\alpha$ ) по сравнению с контролем, что в большей степени справедливо для МФ с экспрессией TNF- $\alpha$ , но превалировали все же МФ с экспрессией GM-CSF (таблица).

Уровни экспрессии активационных рецепторов CD 14 и CD 25 у моно- и бинуклеаров можно расценивать в качестве сопоставимых, что в принципе справедливо также в отношении особенностей экспрессии гидролитических ферментов CatD и MMP-1 у МФ упомянутых классов ядерности (таблица). Из цитокинов с профиброзным эффектом стоит выделить bFGF, экспрессия которого у моно- и бинуклеарных МФ была более значима, чем экспрессия IL-1 (таблица), что указывало на роль продуцирующих их МФ в возможной реализации фиброза.

В общем, интенсивность экспрессии изученных CD рецепторов, цитокинов и ферментов возрастала у моно- и бинуклеарных МФ в культурах ПК, выделенных от БЦЖ-инфицированных животных. Особенно хотелось бы подчеркнуть роль бинуклеарных МФ в экспрессии CD 11, GM-CSF и TNF- $\alpha$  (таблица), обуславливающих мультиноклеацию МФ и потенциальную возможность дальнейшего повышения класса ядерности у бинуклеаров – вероятных предшественников собственно многоядерных МФ, и не исключено, что в перспективе – представителей гигантских многоядерных МФ.

В заключение отметим, что исследование специфики продукции МФ фузогенных медиаторов и экспрессии ими молекул клеточной поверхности, обеспечивающих слияние гистиоцитов – ведущий механизм мультиноклеации МФ в условиях туберкулезного гранулематоза, а также экспрессии МФ активационных CD рецепторов и продукции цитокинов с профиброзным эффектом и гидролитических ферментов способствует пониманию патогенеза туберкулезного гранулематоза, сопряженного с ролью МФ и их бинуклеаров в формировании гранулем, в процессах клеточной активации, фиброзировании и некроза тканей.

По нашему мнению, весьма существенно, что вопросы изучения полинуклеаров содержат комплекс составляющих не только теоретического, но и терминологическо-

го, а также методологического плана. Их дальнейшая эффективная разработка имеет большое значение в процессе выделения основных компонентов теории полинуклеаров и в их адекватном классифицировании. Несомненно, что последующее успешное и всестороннее изучение этих вышеизложенных аспектов фундаментальной медико-биологической проблемы многоядерных гистиоцитарных производных, по всей видимости, обладает кардинальным практическим значением, например, для создания будущих различных информативных способов современной цитологической диагностики длинного ряда различающихся по своей весьма обширной этиологии гранулематозных заболеваний и поиска клеток-мишеней для их эффективной терапевтической коррекции.

#### Список литературы

1. Ильин Д.А. Многоядерные макрофаги. Новосибирск: Наука, 2011. 56 с.
2. Ильин Д.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С. Исследование *in vitro* экспрессии рецепторов CD1, CD14, CD25, CD30, CD35, CD95 макрофагами мышей, инфицированных микобактериями туберкулеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172. № 7. С. 52–55.
3. 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. Vol. 34. No. 7. P. 449–457.
4. Al Shammari B., Shiomi T., Tezera L., Bielecka M.K., Workman V., Sathyamoorthy T., Mauri F., Jayasinghe S.N., Robertson B.D., D'Armiento J., Friedland J.S., Elkington P.T. The Extracellular Matrix Regulates Granuloma Necrosis in Tuberculosis. *J. Infect. Dis*. 2015. Vol. 212. No. 3. P. 463–473.
5. Шкурупий В.А., Ильин Д.А., Архипов С.А. Феномен многоядерности – реакция макрофагов на персистенцию в них *M. tuberculosis* // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. № 11-2. С. 218–222.
6. Zhang L., Yan J.W., Wang Y.J., Wan Y.N., Wang B.X., Tao J.H., Chen B., Li B.Z., Yang G.J., Wang J. Association of interleukin 1 family with systemic sclerosis. *Inflammation*. 2014. Vol. 37. No. 4. P. 1213–1220.
7. Poosti F., Bansal R., Yazdani S., Prakash J., Post E., Klok P., van den Born J., de Borst M.H., van Goor H., Poelstra K., Hillebrands J.L. Selective delivery of IFN- $\gamma$  to renal interstitial myofibroblasts: a novel strategy for the treatment of renal fibrosis. *FASEB J*. 2015. Vol. 29. No. 3. P. 1029–1042.
8. Chen Z., Tan W., Zhang L., Tan Q., Yang J. Beneficial Impact of bFGF Antisense Therapy in a Rat Model of Pulmonary Fibrosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis*. 2015. Vol. 32. No. 1. P. 22–31.
9. Hwang K.E., Shon Y.J., Cha B.K., Park M.J., Chu M.S., Kim Y.J., Jeong E.T., Kim H.R. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is responsible for residual pleural thickening in pleural tuberculosis. *Tohoku J. Exp. Med*. 2015. Vol. 235. No. 4. P. 327–333.
10. Ong C.W., Elkington P.T., Friedland J.S. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2014. Vol. 190. No. 1. P. 9–18.