

С.М. Мирошниченко, Г.А. Коваленко, Н.И. Цирельников, Л.Е. Панин

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛИНИИ A/Sn И БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ

ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, Новосибирск

Проведены исследования функционального состояния перитонеальных макрофагов белых беспородных мышей (Б/б), устойчивых к онкопатологии и мышей линии A/Sn, склонных к развитию онкологических заболеваний. Обнаружено, что при индукции асептического воспаления (вызванного введением крахмала) хемотаксис макрофагов онкологической линии снижен в 2,5–3 раза, способность к адгезии снижена в 1,5–2 раза по сравнению с макрофагами контрольной группы (Б/б). Окраска на F-актин цитоскелета клеток, показала, что при адгезии на субстрат, при межклеточных контактах, а также при инкубации макрофагов с ретиноевой кислотой клетки контрольной группы образуют филоподии. Макрофаги A/Sn при воздействии ретиноевой кислотой образуют псевдоподии. Макрофаги той и другой группы мышей являются продуцентами эндонуклеаз. Одинаковая активность этих ферментов обеспечивалась вдвое меньшим количеством клеток у мышей линии A/Sn.

Ключевые слова: макрофаги, мыши линии A/Sn, белые беспородные мыши, цитоскелет, адгезия, хемотаксис, F-актин, эндоДНКазы.

Характерной особенностью мышей линии A/Sn является высокая частота возникновения различных форм спонтанных новообразований в возрасте 1–1,5 года и гибель животных в раннем возрасте от воспалительных заболеваний [5]. На фоне генетических дефектов, обуславливающих онкопатологию, мыши данной линии обнаруживают резистентность к *Micobacteria tuberculosis* [11]. Миелоидные клетки принимают участие во врожденном и приобретенном иммунитете. Общей чертой этих клеток является их способность к миграции и адгезии. Динамические перестройки цитоскелета сопровождают хемотаксис, адгезию, фагоцитоз, межклеточные взаимодействия, экспрессию генов, апоптоз [13,16,18]. Нарушения любой из этих функций вносит свой вклад в развитие и прогрессирование рака. [9] Если для осуществления противоинфекционного ответа важны нейтрофилы и макрофаги, формирующие первую линию

защиты, то в противоопухолевом иммунитете ключевая роль принадлежит макрофагам и дендритным клеткам [2, 15]. Макрофаги вовлечены в процесс распознавания и элиминацию чужеродных агентов. Именно эндоДНКазы обеспечивают элиминацию всего чужеродного или ставшего таковым, собственного генетического материала. Биохимическим маркером апоптоза считают активацию нуклеаз, когда начинается фрагментация геномной ДНК [20]. Одной из функций нуклеаз, является неспецифическая гуморальная защита от инфекций различной природы [3].

Исследования дефектов функционирования макрофагов, выяснение причин возникновения онкологических заболеваний дают возможность найти пути их терапии.

Материалы и методика

В работе использовали самцов белых беспородных (Б/б) мышей (контрольная группа) и мышей линии A/Sn в возрасте 2–3 мес. из питомника ИЦИГ СО РАН. В 3 независимых экспериментах использовали по 4 мыши в каждой группе. Перитонеальные макрофаги выделяли по стандартной методике. Через 4 суток, после введения крахмала, животных умерщвляли декапитацией под легким эфирным наркозом. Аликвоты лаважа окрашивались трипановым синим, клетки живые и погибшие подсчитывали в камере Горяева. Клетки по 2,4 млн. высаживали на чашки Петри. После 2-х ч. в адгезии сливали инкубационную среду, к макрофагам добавляли по 4 мл свежей инкубационной среды и оставляли в CO₂ инкубаторе на 6 ч, 18 ч, 24 ч. Все процедуры по получению макрофагов, определению их эндоДНКазной активности проводили по описанной ранее методике [1].

В ходе эксперимента, для цитохимических исследований, в чашки Петри помещали покровные стекла для адгезии клеток на них. Во все временные точки (0 ч, 72 ч, 7 сут.) прилипший к стеклам пул клеток окрашивали по Романовскому-Гимза и на F-актин.

Для окраски на F-актин цитоскелета макрофагов стекла фиксировали в 2% растворе параформальдегида (SIGMA) 15 мин., инкубировали с 0,2% TritonX-100 в PBS 2 мин., 15 минут инкубация с rhodamine phalloidin (Invitrogen) 1:100 в PBS. Сканировали и фотографировали стекла в центре коллективного пользования ИЦИГ СО РАН на микроскопе AxioKop2plus (Zeiss), камера AxioCamHRc (Zeiss). Индукцию реорганизации цитоскелета макрофагов проводили ATRA (полностью транс — ретиноевая кислота) 10-7M в ростовой среде. ATRA (SIGMA) предварительно растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 10-2M.

Результаты и обсуждения

В данном эксперименте исследовали жизнеспособность, функционирование перитонеальных макрофагов в течение 7 суток и активность эндонуклеаз в течение 24 ч. у мышей линии A/Sn и Б/б. На рис.1 представлено изменение активности Mg^{2+} -зависимой эндоДНКазы при 0 ч. в инкубации клеток (сразу после адгезии), затем через 6 ч., 18 ч. и через 24 ч. инкубации макрофагов при pH 8,3; 7,2 и 5,0. Эндонуклеазная активность в 0 ч. высокая и одинакова у макрофагов мышей Б/б и A/Sn (в 0 точке пробы разводились в 2 раза). Однако при окрашивании макрофагов A/Sn и Б/б азур-эозином было обнаружено, что при одинаковой плотности посадки клеток в системе *in vitro*, у линии A/Sn адгезированных клеток оказалось в два раза меньше, чем у мышей Б/б. (рис. 2а, б). При сравнении эндоДНКазной активности при щелочном и нейтральном pH макрофагов A/Sn с контрольными, у A/Sn отмечено повышение активности на 18–24% после 18 ч. культивирования и затем к 24 ч. активность фермента понижалась. В остальном динамика эндоДНКазной активности была сходна с таковой у макрофагов Б/б. Активность кислых нуклеаз была одинаковой у A/Sn и в контрольных макрофагах, но как показано выше, обеспечивался этот уровень активности вдвое меньшим количеством клеток. Существенную роль в формировании ответа на любое агрессивное воздействие играют лизосомы. Так кислые нуклеазы лизосом вызывают аутолиз клетки при ее повреждении [12].

Ядерная каспаза-активируемая ДНКаз (CAD) принимает участие в апоптозе клеток [20]. И нами отмечена повышенная гибель клеток A/Sn в течении первых суток инкубации по сравнению с контролем. Это, вероятно, и является одной из причин повышения нуклеазной активности адгезированных макрофагов A/Sn. Возможно, повышенная нуклеазная активность макрофагов мышей линии A/Sn отражает вяло текущий воспалительный процесс. Образование 2–3 ядерных гигантских клеток (см. рис. 2в), при 7 дневном культивировании, хотя и является компенсаторным процессом, направленным на уничтожение чужеродного агента, но и свидетельствует о хроническом течении воспалительного ответа, который является одним из факторов онкологического риска [7].

На индукцию асептического воспаления мыши A/SN отвечают сниженным в 2,5 раза притоком макрофагов в перитонеальную полость по сравнению с контрольными мышами Б/б. В 3 независимых экспериментах в лаваже Б/б было $1,6 \text{ млн.} \pm 0,4 \text{ млн. мф/мл}$, у A/SN — $0,5 \text{ млн.} \pm 0,06 \text{ млн. мф/мл}$. Клетки перитонеального

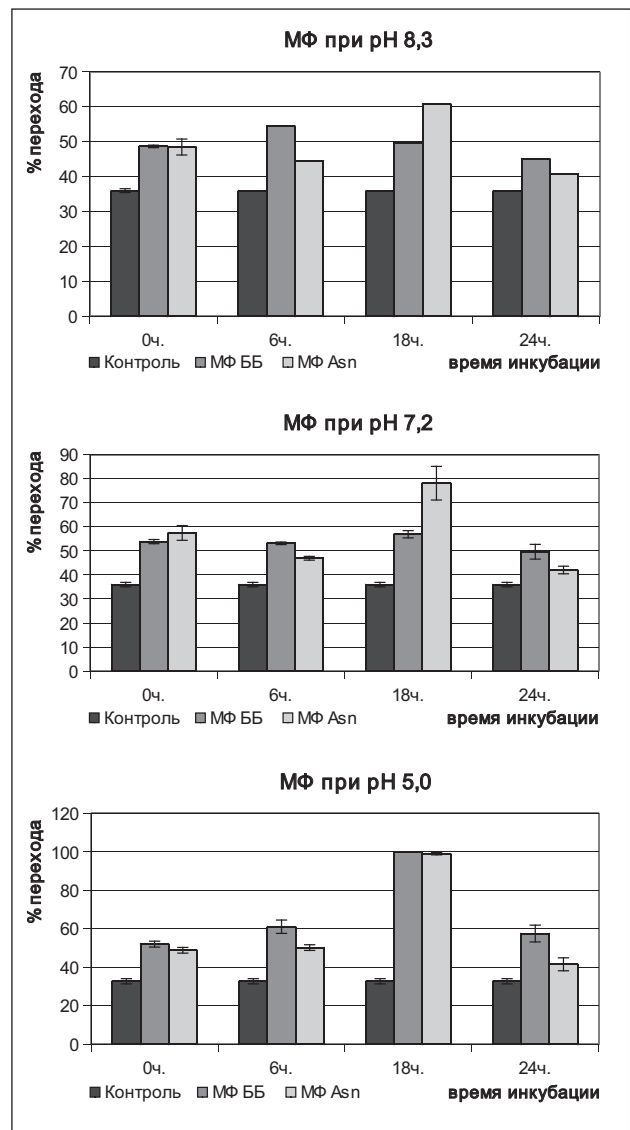


Рис 1. Активность Mg^{2+} — эндоДНКазы в макрофагах мышей линии A/SN и Б/б при инкубации клеток перитонеальных макрофагов при pH 8,3, 7,2 и 5,0.

По оси абсцисс отложено время инкубации, по оси ординат — % перехода суперскрученной ДНК плазмиды в кольцевую. Контроль — термостатированная ДНК плазмиды Bluescript. Достоверное отличие по сравнению с контролем ($p < 0,002$)

экссудата мышей A/SN были гетерогенны по размеру и содержали островки слипшихся клеток. Перитонеальный экссудат мышей Б/б был более однотипен и не содержал слипшихся клеток.

Макрофаги Б/б были количественно адгезированы, супернатант содержал незначительное количество клеток, большая часть которых была погибшей, (окрашивалась трипановым синим), окраска на F-актин практически отсутствовала. Не адгезированный пул клеток A/SN содержал как окрашенные трипановым синим погибшие клетки, так и мелкие клетки 8–10 $\mu\text{м}$ имеющие окраску на F-актин, при витальной окраске акридиновым оранжевым плавающие клетки имели вид живых. Таким образом, перитонеальный экссудат мышей A/SN содержит клетки с на-

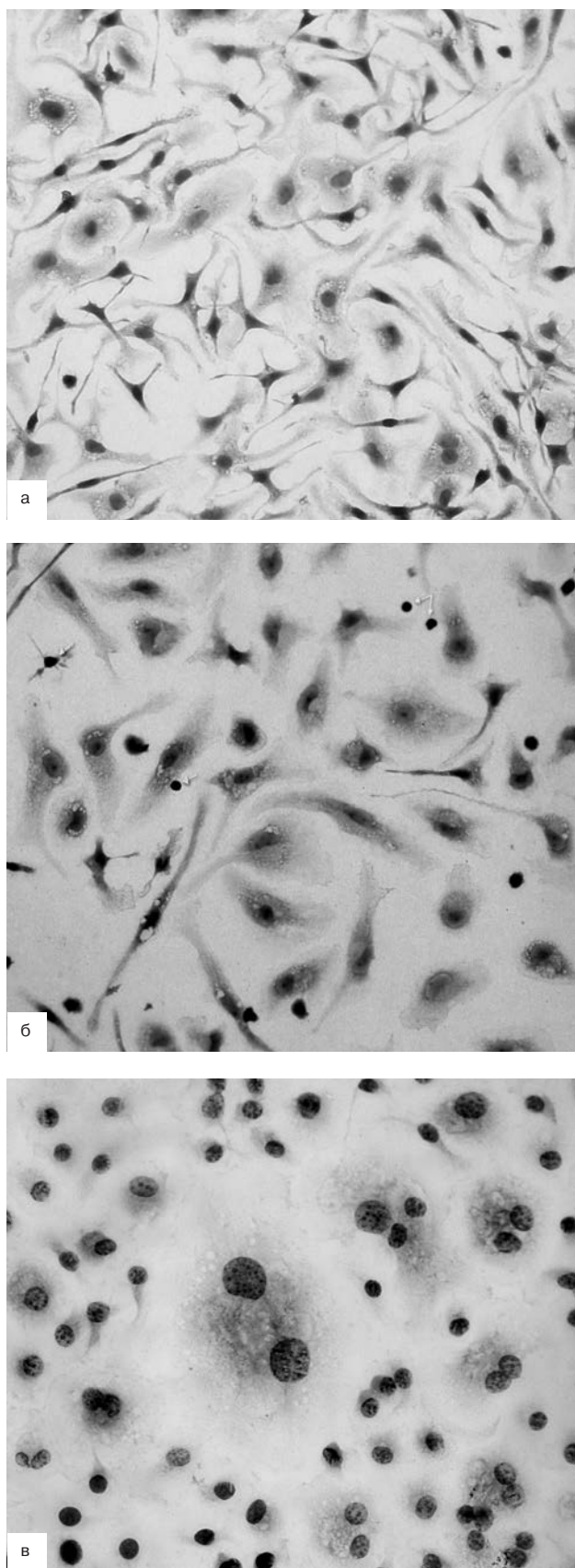


Рис. 2. Перитонеальные макрофаги A/SN и Б/б окраска по Романовскому-Гимза, объектив $\times 40$, увеличение 400.

а, б — клетки инкубировались в течение 18 часов после адгезии.
а — макрофаги Б/б;

б — макрофаги A/SN (стрелками показаны погибшие клетки);

в — макрофаги A/SN при инкубации в течение 7 суток, в моно-
слое макрофагов гигантские 2–3-х ядерные клетки

рушенной адгезией к субстрату и конгломераты слипшихся клеток — скорее всего у данных мышей есть нарушения в экспрессии адгезионных молекул.

Процесс распластывания клеток является результатом последовательной разборки цитоскелета и следующей за ней стадией сборки с полимеризацией актина на краях клетки. Распластывающаяся клетка имеет филаподии, складки клеточного края, различные выпячивания поверхности, что помогает ей контактировать с субстратом и другими клетками [4,6]. В наших исследованиях в 0 точке, после 2-часовой адгезии клеток, макрофаги Б/б из суспензионного состояния переходят к адгезированному, образуя филоподии, точки контакта с субстратом, имеют слегка поляризованную форму, актин ярко выражен (рис. 3а) Макрофаги A/Sn после двух часов адгезии недостаточно распластаны клетки округлые, выглядят рыхлыми, филоподий нет (рис. 3б).

В качестве индуктора реорганизации цитоскелета использовали ATRA. Ретиноевая кислота является индуктором дифференцировки бластных клеток. Этот процесс сопровождается увеличением количества молекул адгезии на бластных клетках, поляризацией клеток и реорганизацией актинового цитоскелета [14, 17]. ATRA, добавленная в среду для культивирования в период адгезии, стимулировала распластывание и поляризацию клеток с образованием филоподий у макрофагов Б/б в 0 точке (рис. 4а). Воздействие ATRA на макрофаги Б/б в течении 7 суток увеличивало количество филоподий по всей поверхности клеток, регулировало плотность макрофагов в монослое (рис. 4б).

Распластывание макрофагов A/SN в присутствии ATRA в течение 72 ч. происходило без образования филоподий, но с полимеризацией актина на краях широких протрузий (рис. 4в). При инкубации с ATRA в течение 7 суток макрофаги A/SN образовывали микровыросты цитоплазмы (рис. 4г). В наших исследованиях в ходе эксперимента получали также перитонеальные макрофаги без предварительной стимуляции крахмалом. Такие макрофаги A/Sn и Б/б имели сходный фенотип при культивировании в течении 72 часов. (рис. 5а,в) Добавление ATRA в культуральную среду стимулировало образование филоподий у макрофагов Б/б (рис. 5б), макрофаги A/Sn были поляризованы и образовывали длинные псевдоподии (рис. 5г).

Клетки моноцитарно-макрофагальной системы выполняют в организме ряд функций: уничтожают чужеродные вещества и участвуют в механизмах включения и регуляции иммунного ответа. В первом случае это неспецифическое

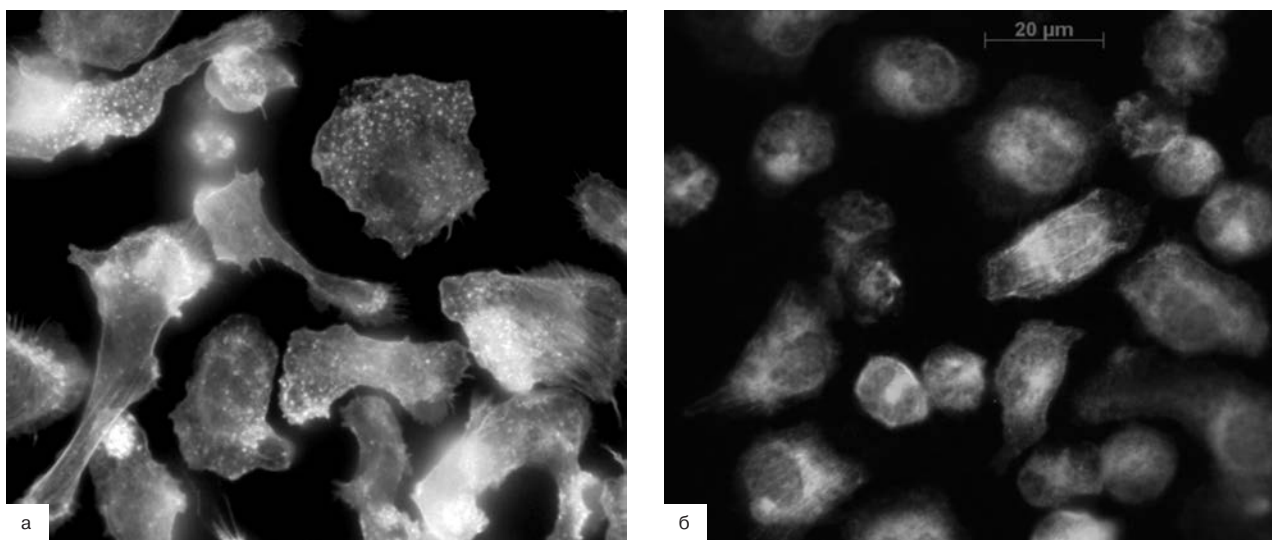


Рис. 3. Перитонеальные макрофаги мышей линии А/SN и Б/б (0 точка, после 2 ч. адгезии), окраска актиновых структур родамин-фаллоидином. Флуорисцентная микроскопия, объектив $\times 100$, увеличение 1000.
а — макрофаги Б/б, клетки имеют актин богатые контакты с субстратом; б — макрофаги А/Sn, рыхлая структура F-актина

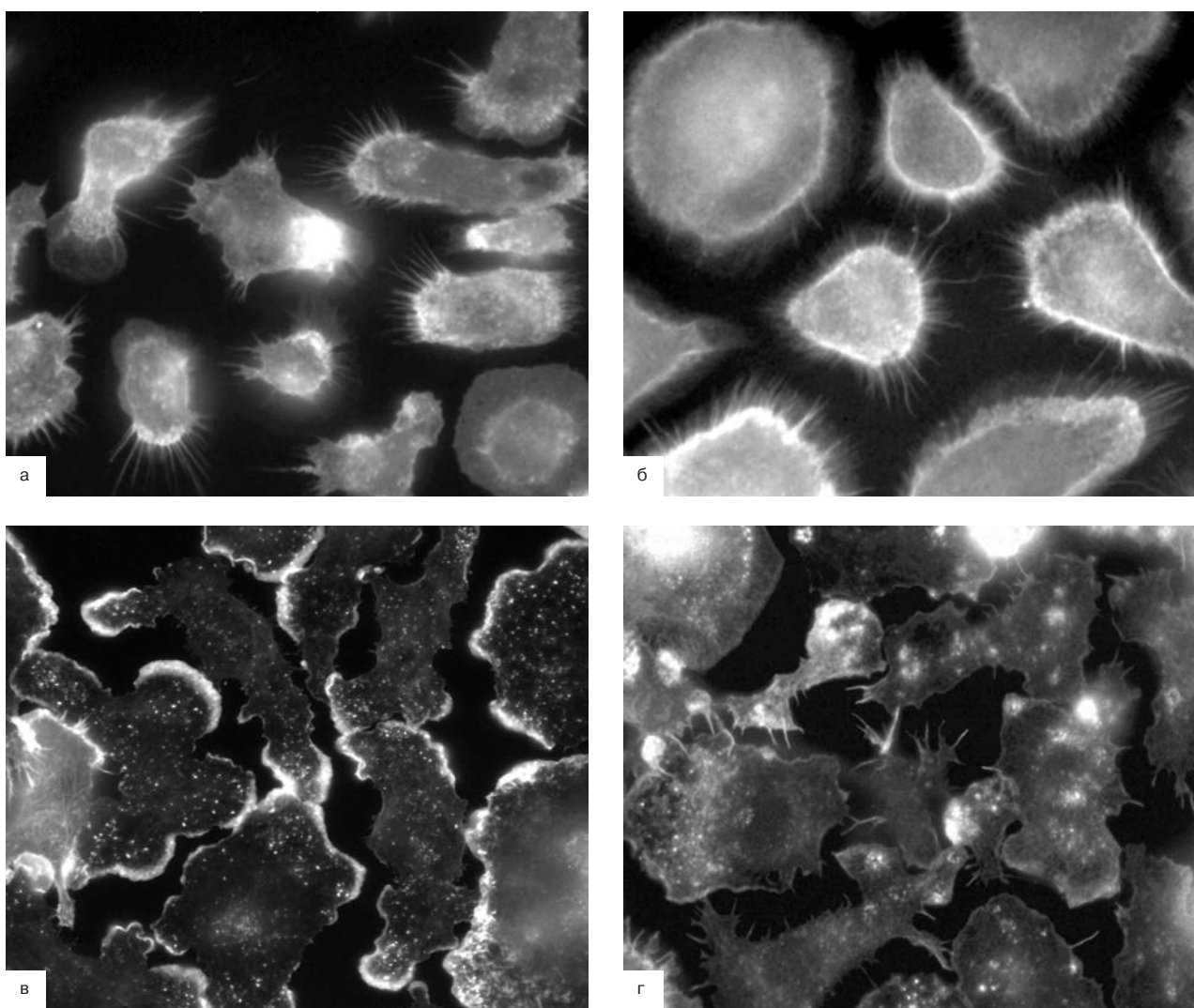


Рис. 4. Перитонеальные макрофаги А/SN и Б/б, инкубация с АТРА 10-7М, окраска актиновых структур родамин-фаллоидином. Флуорисцентная микроскопия, объектив $\times 100$.
а — макрофаги Б/б, 0 точка (адгезия в присутствии АТРА 10-7М) — поляризация клеток, активное образование филоподий,
б — макрофаги Б/б, инкубация с АТРА 10-7 М в течении 7 суток, многочисленные филоподии в виде ворсинок, подобные ворсинки наблюдаются по всей поверхности клеток; в — макрофаги А/Sn, инкубация с АТРА 10-7М в течении 72 часов, поляризация клеток, актин богатые протрузии; г — макрофаги А/SN, инкубация с АТРА 10-7М в течении 7 суток — образование микровыростов цитоплазмы

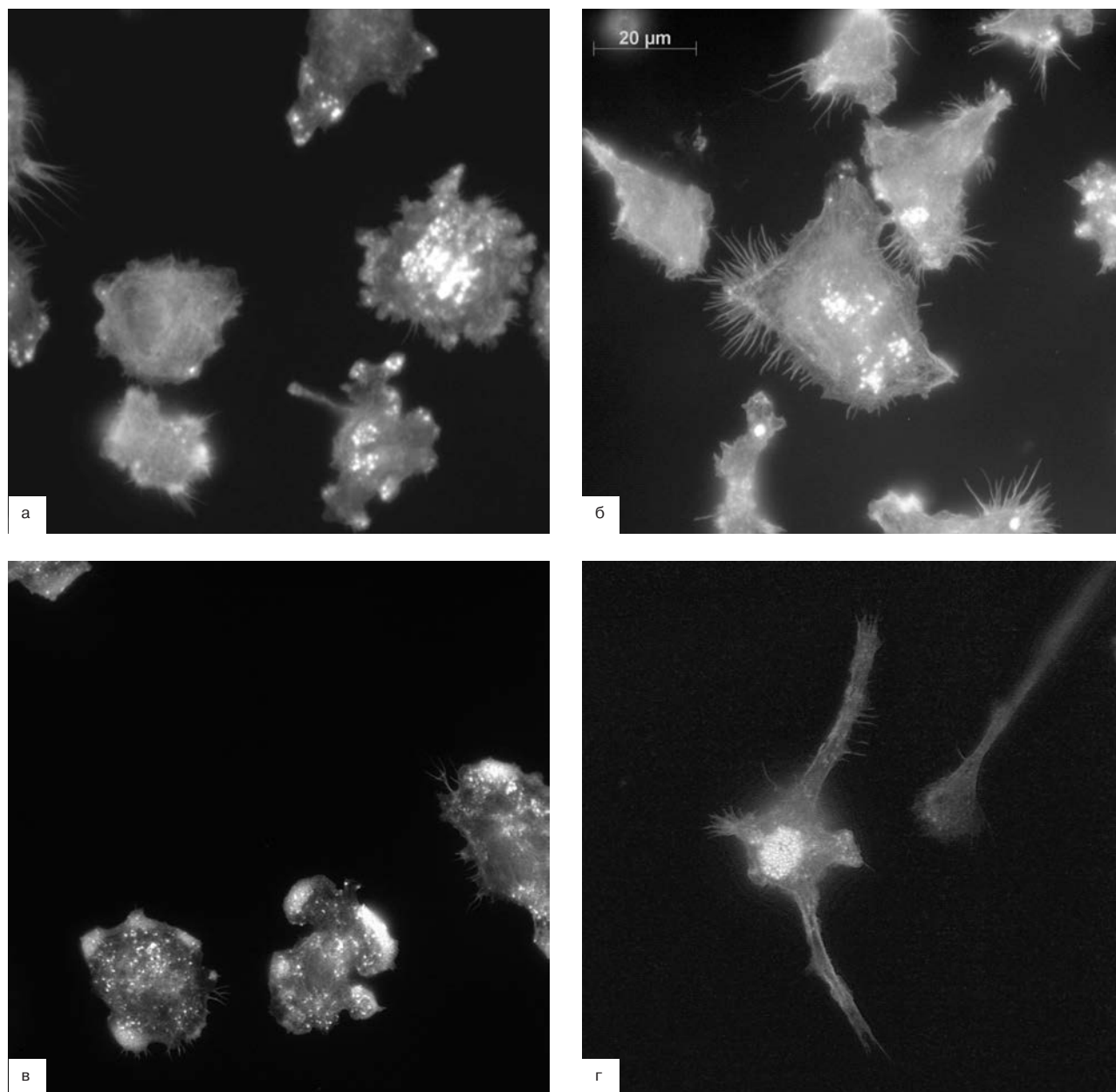


Рис. 5. Перитонеальные макрофаги (без стимуляции крахмалом) A/SN и B/6. Окраска актиновых структур родамин-фаллоидином. Флуорисцентная микроскопия, объектив $\times 100$, увеличение 1000.

- а — Макрофаги B/6, 72 часа культивирования — актин богатые контакты с субстратом, протрузии;
 б — Макрофаги B/6, инкубация с ATRA 10-7M в течении 72 часов — многочисленные актин богатые филоподия подобные ворсинки;
 в — Макрофаги A/Sn, 72 часа культивирования — ярко выраженные актин богатые протрузии и контакты с субстратом;
 г — макрофаги A/Sn, инкубация с ATRA 10-7M—активное образование длинных псевдоподий

распознавание вторгшегося агента, основанное на адгезионных контактах [2].

Можно предположить, что опухолевые клетки у мышей A/SN могут плохо распознаваться клетками иммунной системы за счет нарушения экспрессии некоторых молекул адгезии у макрофагов. Известно, что семейство малых GTPas регулирует процессы реорганизации цитоскелета и тем самым управляет адгезией и миграционным поведением клеток. При этом Rho и Cdc42 GTPазы регулируют образование ламеллоподий и филоподий соответственно [21]. Ответом на воздействие ретиноевой кислоты

является, Cdc42 опосредованное, образование филоподий [10]. В наших исследованиях у макрофагов A/SN явно снижена (изменена) способность отвечать подобным образом. Сниженный хемотаксис у A/SN может быть опосредован не только нарушением представительства молекул адгезии на их поверхности, но и нарушением именно направленной миграции клеток. Известно, что за направленную миграцию отвечают Rho GTPазы Cdc42, Rac1 [8]. Созревание и дифференцировка миелоидных клеток сопровождается изменениями в экспрессии малых GTPаз, при этом развитие моноцитов в направлении

зрелых дендритных клеток сопровождается ростом числа маркеров — Rac1, Cdc42 [19]. В последнее время уделяют много внимания получению дендритных клеток и противоопухолевой терапии на их основе [15]. Наблюдаемые нами изменения миграции, адгезии и реорганизации цитоскелета у макрофагов A/SN позволяют предположить наличие нарушений в экспрессии малых GTPаз, которые контролируют эти процессы. Rho GTPазы играют ключевую роль в регуляции многих клеточных функций, связанных со злокачественной трансформацией, и часто рассматриваются в качестве объектов для противоопухолевой терапии [9]. Мыши линии A/SN интересны в качестве модели для таких исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Дударев А.Н., Антипова Е.Н., Коваленко Г.Ф., Усынин И.Ф. ЭндоДНКазная активность перитонеальных макрофагов // Бюллетень СО РАМН — 2007. — №5. — С. 99–101.
- Зубова С.Г., Окулов В.Б. Роль молекул адгезии в процессе распознавания чужеродных и трансформированных клеток макрофагами млекопитающих // Успехи соврем. Биол. — 2001. — Т. 121. — С. — 59–66.
- Коваленко Г.А. Индукция ДНКазной активности в сыворотке крови как механизм резистентности к инфекциям в организме человека и животного // Вест. РАМН. — 2001. — № 2. — С. 25–28
- Пинаев Г.П. Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций // Цитология — 2009. — Т. 51. — №3. — С. 172–180.
- Харьковская Н.А., Краснова Т.А., Клепиков Н.Н., Онкологическая и генетическая характеристика мышей A/SN // Экспер. Онкол. — 2000. — № 22. — С. 157–159.
- Шутова М.С., Александрова А.Ю. Сравнительное исследование расщепления нормальных и трансформированных фибробластов. Роль полимеризации микрофиламентов и актин-миозинового сокращения // Цитология — 2010 — Т. 52. — № 1. — С. 41–51.
- Щепеткин И. А. Макрофагальные поликарioni // Успехи физиол. наук — 2000. — Т. 31. — С. 14–31.
- Barry I. Hudson, Anastasia Z. Kalea Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous -1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42 // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 34457–34468.
- Ellenbroek S.I., Collard J.G. Rho GTPases: functions and association with cancer // Clin. Exp. Metastasis — 2007. — Vol. 24. — P. 657–672.
- Endo M., Antonyak M.A., Cerione R.A. Cdc42-mTOR signaling pathway controls Hes5 and Pax6 expression in retinoic acid-dependent neural differentiation // J. Biol. Chem. — 2009. — Vol. 284. — P. 5107–5118.
- Eruslanov E.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K. et al. Neutrophil responses to mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice // Infect. Immun. — 2005. — Vol. 3 — P. 1744–1753.
- Eskelinen E.L., Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway a central role in health and disease // Biochim. Biophys. Acta — 2009. — Vol. 1793. — P. 664–673.
- Fazal F., Minhajuddin M., Bijli K.M. et al. Evidence for actin cytoskeleton-dependent and independent for RelA/p65 nuclear translocation in endothelial cells // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282. — P. 3940–3950.
- Olins A.L., Herrmann M., Lichter P. Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization // Exp. Cell Res. — 2000. — Vol. 125 — P. 130–142.
- Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells // Nat. Rev. Cancer — 2012. — Vol. 12. — P. 265–277.
- Parent C.A. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium // Curr. Opin Cell Biol. — 2004. — Vol. 16. — P. 4–13.
- Rego E.M., Desantis G.C. Differentiation syndrome in promyelocytic leukemia clinical presentation, pathogenesis and treatment // Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. — 2011-3 (1): e2011048/doi:10.4084/MJHID.2011.048.
- Robin C., Laura M. Phagocytosis and actin cytoskeleton // J. Cell Science — 2001. — Vol. 114. — P. 1061–1077.
- Suzanne F.G. van Helden, Eloise C. Anthong, Rob and Peter I. Horijk. Rho GTPase expression in human myeloid cells // PLOS ONE — 2012-7 (8): e42563/doi:10.1371/journal.pone.0042563.
- Widlak P., Garrard W.T. Ionik and cofactor requirements for the activity of the apoptosis endonuclease DFF40/CAD // Mol. Cell. Biochem. — 2001. — Vol. 218. — P. 125–130.
- William E. Allen, Daniel Zicha, Anne J. Ridley et. al. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis // J. Cell Biol. — 1998. — Vol. 141. — P. 1147–1157.

S.M. Miroshnichenko, G.A. Kovalenko, N.I. Tsyrennikov, L.E. Panin

COMPARATIVE ANALYSIS OF MORPHOFUNCTIONAL INDICATORS OF PERITONEAL MACROPHAGES IN MICE OF THE CANCER LINE A/SN AND WHITE OUTBRED MICE

Research Institute of Biochemistry, Siberian Branch of RAMS, Novosibirsk

A study of the functional state of peritoneal macrophages was conducted of white outbred mice (W/o) which were resistant to cancer pathology as well as the mice of the A/sn line prone to development of cancer diseases. It was revealed that due to induction of aseptic inflammation (induced by starch administration), chemotaxis of macrophages of the oncological line was 2.5–3 times reduced and capacity to adhesion was 1.5–2 times lower than capacity of macrophages of the control group (W/o). The paint on F-actin of cytoskeleton in cells showed that cells of the control group form filopodia as a result of adhesion to the substrate, during intercellular contacts as well as during macrophage incubation with retinoic acid. Macrophages A/sn can form pseudopodia when exposed to retinoic acid. Macrophages of both groups of mice were shown to be producer of endonucleases. The same activity of these enzymes was provided by the number of cells which was 1.5–2 times fewer in mice of the A/sn line.

Поступила в редакцию 24.07.2013