

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ И АНТИАПОПТОЗНОГО БЕЛКА BCL-2 ВО ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ МИКОБАКТЕРИЙ С КЛЕТКАМИ-ХОЗЯЕВАМИ В ГРАНУЛЕМАХ МЫШЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Е.Г. Уфимцева

НИИ биохимии, Новосибирск, e-mail: ufim1@ngs.ru

Макрофаги являются клетками-хозяевами для вызывающих туберкулез (ТБ) микобактерий, которые способны персистировать в макрофагах годами и даже десятилетиями (Lawn, Zumla, 2011). Латентный бессимптомный этап ТБ инфекции характеризуется образованием провоспалительных гранул – структурных скоплений иммунных клеток: макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов, содержащих микобактерии. Апоптоз клеток, инфицированных микобактериями, считается одним из главных механизмов борьбы организма животных и человека с ТБ инфекцией (Behar, et al., 2011).

В наших исследованиях мышинных гранул в культуре *ex vivo* не были выявлены морфологические признаки гибели клеток-хозяев с разной степенью зараженности микобактериями вакцины БЦЖ (аттенюированный штамм *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin, BCG) ни по механизмам апоптоза, ни по пути некроза при латентной ТБ инфекции мышей линии BALB/c (Ufimtseva, 2013, 2015, 2016). С помощью световой и конфокальной микроскопии препаратов клеток, окрашенных иммуноцитохимически и/или иммунофлуоресцентно, в данной работе были проанализированы мышинные гранулемы и контрольные макрофаги на наличие индукторов, ингибиторов и маркеров апоптозной гибели клеток.

Во всех гранулемах из селезенки исследованных мышей обнаружили значительное количество макрофагов как с микобактериями, так и без микробов, цитоплазма которых была окрашена на провоспалительный цитокин и индуктор апоптоза TNF α , часто очень интенсивно. При этом рецептор CD30, входящий в подгруппу рецепторов выживания суперсемейства рецепторов к белку TNF α и модулирующий влияние цитокина на жизнеспособность клеток, выявили на плазматической мембране только небольшого числа макрофагов гранулем.

Мультифункциональный скэвинджер-рецептор CD36, один из активаторов каспаз и апоптоза, обнаружили на мембранах большого числа макрофагов, дендритных клеток и лимфоцитов гранулем. Следовательно, макрофаги гранулем мышей с повышенным количеством рецепторов CD36 были предрасположены не только к поглощению погибших лимфоцитов и тромбоцитов гранулем, что ранее наблюдали, но и к своей деструкции по каспазозависимым механизмам апоптоза в процессе развития у мышей латентной ТБ инфекции.

Большинство клеток гранулем мышей также содержали рецептор смерти Fas/CD95 в повышенном количестве как в микродоменных структурах, так и по всей поверхности плазматической мембраны клеток и, соответственно, были готовы к реализации запуска апоптоза по одному из рецепторных механизмов.

Для обнаружения проапоптозных белков Bax и Bad использовали антитела, выявлявшие их общие формы без учета конформационно-измененных или фосфорилированных форм. Белки Bax и Bad выявили во всех клетках гранулем мышей, поскольку они являются конститутивными белками клеток млекопитающих и всегда присутствуют в цитоплазме. Однако колокализация белков Bax и Bad на небольших округлых структурах разного размера, расположенных дискретно на периферии от ядра и, возможно, являющихся митохондриями, указывала на их совместное проапоптозное действие в клетках гранулем мышей.

Белок P53, при накоплении в клетках запускающий программу стресс-зависимого митохондриального пути апоптоза, не наблюдали ни в цитоплазме, ни в ядрах макрофагов и дендритных клеток гранулем как содержащих микобактерии, так и не имевших микробов. Следовательно, стабилизации и накопления белка P53 в клетках гранулем мышей не установили, что также указывало, вместе с неизменной морфологией их ядер без признаков конденсации хроматина и сегрегации ядрышек, на отсутствие повреждений ДНК в клетках гранулем и, опосредованно, на недостаток митохондриальных активаторов этого процесса.

Активацию каспазы-3, как одного из главных маркеров развития апоптозной гибели клеток, анализировали с использованием антител к экзекUTORной форме этого фермента и обнаружили в цитоплазме только единичных макрофагов, дендритных клеток, фибробластов и мегакариоцитов гранулем мышей.

Таким образом, в гранулемах на латентной стадии ТБ инфекции мышей при повышенном содержании индуктора апоптоза TNF α , проапоптозных белков Bax и Bad, рецептора смерти Fas/CD95 и скэвинджер-рецептора CD36 не выявили ни стабилизации белка P53, ни активации каспазы-3 в макрофагах и дендритных клетках вне зависимости от присутствия в них микобактерий. Соответственно, блокирование развития апоптозной гибели клеток могло происходить, вероятно, на стадии обратимых изменений до начала действия митохондриальных и постмитохондриальных факторов и эффекторов апоптоза.

Белок Bcl-2 считается одним из главных защитников клеток от нарушений проницаемости мембраны митохондрий и развития апоптоза (Van Loo, et al., 2002). При иммуноцитохимическом выявлении белка Bcl-2 наблюдали интенсивное окрашивание на данный маркер цитоплазмы подавляющего большинства макрофагов, дендритных клеток, фибробластов и других клеток гранулем мышей. При иммунофлуоресцентной визуализации выявили как диффузное окрашивание на Bcl-2 антиген цитоплазмы макрофагов гранулем, и с микобактериями и без них, так и интенсивное мечение небольших округлых структур разного размера, дискретно расположенных по всему пространству клеток. Часть дискретных структур, окрашенных на белок Bcl-2, колокализовалась с красителем митохондрий MitoTracker Deep Red FM. Белок Bcl-2 также колокализовался с флуоресцентным прижизненным потенциал-зависимым красителем митохондрий DiOC₆ на небольших дискретных структурах аналогичного размера, как и при окраске MitoTracker, по всей цитоплазме макрофагов гранулем. Также выявили колокализацию белка Bcl-2 с проапоптозным белком Bax в клетках гранулем. В макрофагах культур клеток костного мозга и перитонеального экссудата интактных мышей, контрольных или зараженных BCG микобактериями *in vitro*, активации продукции белка Bcl-2 не обнаружили в течение 4-120 ч анализа (Ufimtseva, 2017). Таким образом, гранулемы мышей с латентной ТБ инфекцией характеризовались повышенным содержанием белка Bcl-2 в различных компартментах клеток, в том числе и на митохондриях, вне зависимости от присутствия в клетках микобактерий.

Во время анализа на конфокальном микроскопе клеток гранулем, выделенных из селезенки мыши 23 и окрашенных с использованием антител на белок Bcl-2 и красителя DiOC₆, а затем фиксированных, наблюдали постепенное исчезновение зеленого сигнала в процессе тестирования. Это событие указывало на постепенную миграцию красителя DiOC₆ из митохондрий в результате деполяризации их мембран и снижения величины мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) в погибших после фиксирования макрофагах гранулем, тогда как интенсивность красного сигнала, соответствующего белку Bcl-2, не изменялась. Также отметим, что после прижизненной длительной процедуры окрашивания макрофаги гранулем мыши 23 сохранили неизменную морфологию и самих клеток и митохондрий в них, как и целостность ядер.

Однако в аналогичных опытах с контрольными перитонеальными макрофагами интактных мышей обнаружили проапоптозные изменения их морфологии при отсутст-

вии окраски на белок Bcl-2 и минимальной флуоресценции красителя DiOC₆. Также выявили фрагментацию ядер перитонеальных макрофагов, характерную для апоптозной гибели клеток, и точечные сигналы красителя DiOC₆ в околоядерных районах, указывавшие на сниженный $\Delta\Psi_m$ митохондрий. Вероятно, в процессе окрашивания из-за отсутствия белка Bcl-2 происходило быстрое развитие гибели контрольных перитонеальных макрофагов с разрушением их ядер и пространственно ориентированной сети митохондрий с перемещением органелл в зону ядра.

Ранее мы установили (Ufimtseva, 2015), что треть макрофагов гранулем из селезенки мыши 23 содержали значительное количество микобактерий, в том числе и размножающиеся в колониях с корд-морфологией, что является признаком вирулентности микобактерий. Однако во всех макрофагах гранулем мыши 23, интенсивно окрашенных на антиапоптозный белок Bcl-2, не наблюдали морфологических признаков гибели клеток ни по механизмам апоптоза, ни по пути некроза. Следовательно, белок Bcl-2, обнаруженный в больших количествах и в цитоплазме и на митохондриях макрофагов гранулем мыши 23, мог быть одним из факторов защиты клеток от гибели как при проведении длительных процедур прижизненной окраски в культуре *ex vivo*, так, вероятно, и *in vivo* в гранулемах с большим числом инфицированных клеток.

В результате, по совокупности полученных данных предположили, что именно повышенная продукция антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках гранулем и его локализация в больших количествах на митохондриях могли внести существенный вклад в сохранение жизнеспособности клеток гранулем не только в культуре *ex vivo* или в процессе прижизненного окрашивания на ряд маркеров, но и в организме мышей на разных сроках латентной ТБ инфекции при значительном давлении микобактериальных, провоспалительных и проапоптозных факторов.

Литература

Behar S., Martin C., Booty M., Nishimura T., Zhao X., Gan H., Divangahi M., Remold H. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* // *Mucosal Immunology*. – 2011. – V. 4. – P. 279–287.

Lawn S., Zumla A. Tuberculosis // *Lancet*. – 2011. – V. 378. – P. 57–72.

Ufimtseva E. Differences between *Mycobacterium*-host cell relationships in latent tuberculous infection of mice *ex vivo* and mycobacterial infection of mouse cells *in vitro* // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Article ID 4325646. – P. 1–21.

Ufimtseva E. Investigation of functional activity of cells in granulomatous inflammatory lesions from mice with latent tuberculous infection in the new *ex vivo* model // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2013. – Article ID371249. – P. 1–14.

Ufimtseva E. *Mycobacterium*-host cell relationships in granulomatous lesions in a mouse model of latent tuberculous infection // *BioMed Research International*. – 2015. – Article ID948131. – P. 1–16.

Ufimtseva E. The control of apoptotic death in the cells of granulomatous inflammatory lesions from mice with latent tuberculous infection in the *ex vivo* model // *Immunome Research*. – 2017. – V. 13. – Article 128. – P. 1–19.

Van Loo G., Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin S., et al. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*. – 2002. – V. 9. – P. 1031–1042.