

І. Ф. Ільїнська, О. М. Зубрійчук ІНФІКОВАНІСТЬ МІКОБАКТЕРІЯМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА ІНДУКОВАНИЙ НИМИ АПОПТОЗ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗІ

ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського АМН України"

Відомо, що провідна роль як в елімінації, так і в персистенції мікобактерій туберкульозу (МБТ) належить фагоцитуючим клітинам моноцитарно-макрофагального та нейтрофільного ряду. Інфікування МБТ відбувається за рахунок активного поглинання цих мікроорганізмів макрофагами (Мф), моноцитами (Мц) та нейтрофілоцитами (Нф), після чого може відбуватися або повне знищення останніх за рахунок активації внутрішньоклітинних бактерицидних механізмів, або процесінг із наступною антигенпрезентацією та індукцією адаптивної імунної відповіді, або апоптоз. Апоптозу — програмованій смерті (ПС) фагоцитуючих клітин належить одне із головних місць у виникненні та підтриманні тривалої персистенції МБТ (рис. 1), яка з одного боку, забезпечує певний рівень протитуберкульозного імунітету (в т.ч. поствакцинального), а з іншого — виступає джерелом ендогенної мікобактеріальної інфекції, яка за несприятливих змін імунологічної реактивності макроорганізму активується й викликає маніфестацію захворювання [1].

При вивченні апоптозу фагоцитуючих клітин, індукованого МБТ, були визначені певні взаємозв'язки між інтенсивністю ПС та деякими біологічними властивостями цього збудника, такими, як їх вірулентність та життєздатність. Так, Seah G.T. та Rook G.A., 2001 [9], Galietti F. та співавт. [8] повідомляють, що інфікування МБТ Мц крові спричиняє суттєве (у декілька разів) зростання апоптозу цих клітин, при використанні *M. bovis* ці зміни значно менші, а *M. avium* зовсім не викликає будь-яких змін інтенсивності ПС. В той же час, Keane J. та співавт. стверджують, що саме авірулентні МБТ (H37Ra) призводять до виразного апоптозу перитоніальних Мф мишей BALB/c [6]. Деякі автори вважають, що здатність ініціювати процеси ПС клітин імунного захисту притаманна лише живим МБТ [10], інші вважають, що як живі, так і вбиті мікобактерії здатні змінювати інтенсивність апоптозу фагоцитуючих клітин завдяки присутності певних субстанцій — модулінів [5]. Тому досить багато досліджень було присвячено вивченню апоптогенних властивостей окремих субстанцій МБТ, зокрема ліпоарабіноманана (ЛАМ), корд фактора, міколової та туберкулостеаринової кислот, тощо. Вважається, що ЛАМ, який найчастіше пов'язують з вірулентністю МБТ, корд фактор та міколова кислота спричиняють гноблення МБТ-індукованого апоптозу в Мф, а туберкулостеаринова кислота, навпаки, викликає ранню смерть фагоцитуючих клітин [4, 7].

Відомо, що характер та інтенсивність впливу будь-яких субстанцій природного чи штучного походження на функціональну активність біологічних об'єктів, як правило, значною мірою залежить від дози останніх. Проте ми не знайшли жодних повідомлень про залежність апоптозу фагоцитуючих клітин, індукованого МБТ, від кількості останніх. Але, на наш погляд, вирішення цього питання має важливе значення з огляду на те, що надходження МБТ в макроорганізм може відбуватися як незначними (в

природних умовах), так і досить великими (у вогнищах інфекції) дозами.

Тому метою даної роботи було вивчення особливостей впливу інфікування різними дозами МБТ на індукований ними апоптоз циркулюючих фагоцитів при туберкульозі (ТБ).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження за кошти держбюджету було проведено у 15 хворих на ТБ легень віком від 18 до 53 років (середній вік склав $(32,5 \pm 3,0)$ років), в т.ч. 10 чоловіків та 5 жінок, які перебували на стаціонарному лікуванні в ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України". У 12 пацієнтів (80,0 %) туберкульозний процес в легенях було діагностовано вперше, у 3-х осіб (20,0 %) мав місце рецидив ТБ. Інфільтративні зміни були визначені у 11 випадках (73,3 %), у решти — 4 хворих (26,7 %) спостерігався дисемінований ТБ легень. Контрольна група складалася з 15 здорових осіб — донорів крові та волонтерів без клінічних ознак соматичної патології віком від 21 до 40 років.

В роботі використовували монослой адгерентних Нф та Мц, чисті популяції яких отримували шляхом розділення клітин периферичної крові на подвійному градієнті щільності фікол-верографіна ($1,090 \text{ г/см}^3$ та $1,078 \text{ г/см}^3$), після чого по 50 мкл відповідної клітинної суспензії в концентрації $2,0 \cdot 10^6$ /мл додавали в лунки предметних скелець (для оцінки апоптозу — з обмежувальними кільцями, для оцінки інфікованості фагоцитів — без них [2]), проводили їх інкубацію у вологій інкубаційній камері при 37°C протягом 15 хвилин для Нф та протягом 45 хвилин для Мц, після чого отримані препарати промивали послідовно в двох склянках з фосфатним буфером $\text{pH} = 7,2$.

Для оцінки інфікованості фагоцитів МБТ (бактеріального навантаження) в дослідні проби вносили по 50 мкл вакцинного штаму БЦЖ (філіал "Медгамал" ГУ НИИЕМ ім. Гамалії РАМН, Москва, Росія) в 3-х концентраціях (25, 50 та 100 мкг/мл на поживному середовищі 199), проводили їх інкубацію протягом 60 хв. при 37°C після чого промивали двічі в фосфатному буфері, висушували на відкритому повітрі, фіксували метанолом та в 2 етапи здійснювали фарбування препаратів: на першому карболовим фуксином Циля фарбували мікобактерії, після чого скельця промивали послідовно водою та 96° етанолом і висушували. На другому етапі фагоцитуючі клітини дофарбовували протягом 4 хвилин 1 % спиртовим розчином діамантового зеленого [1]. На світловому мікроскопі під масляною імерсією (при збільшенні $\times 500$; $\times 900$) підраховували відсоток клітин, які містили внутрішньоклітинно нативні мікобактерії.

Для визначення апоптозу Нф та Мц, індукованого різними дозами МБТ, проводили їх інфікування, як наведено вище. Після цього здійснювали повторну інкубацію в повному поживному середовищі RPMI (з антибіотиками, ембріональною телячою сироваткою та HEPES) у вологій камері при 37°C ще протягом 60 хвилин. По її завершенні

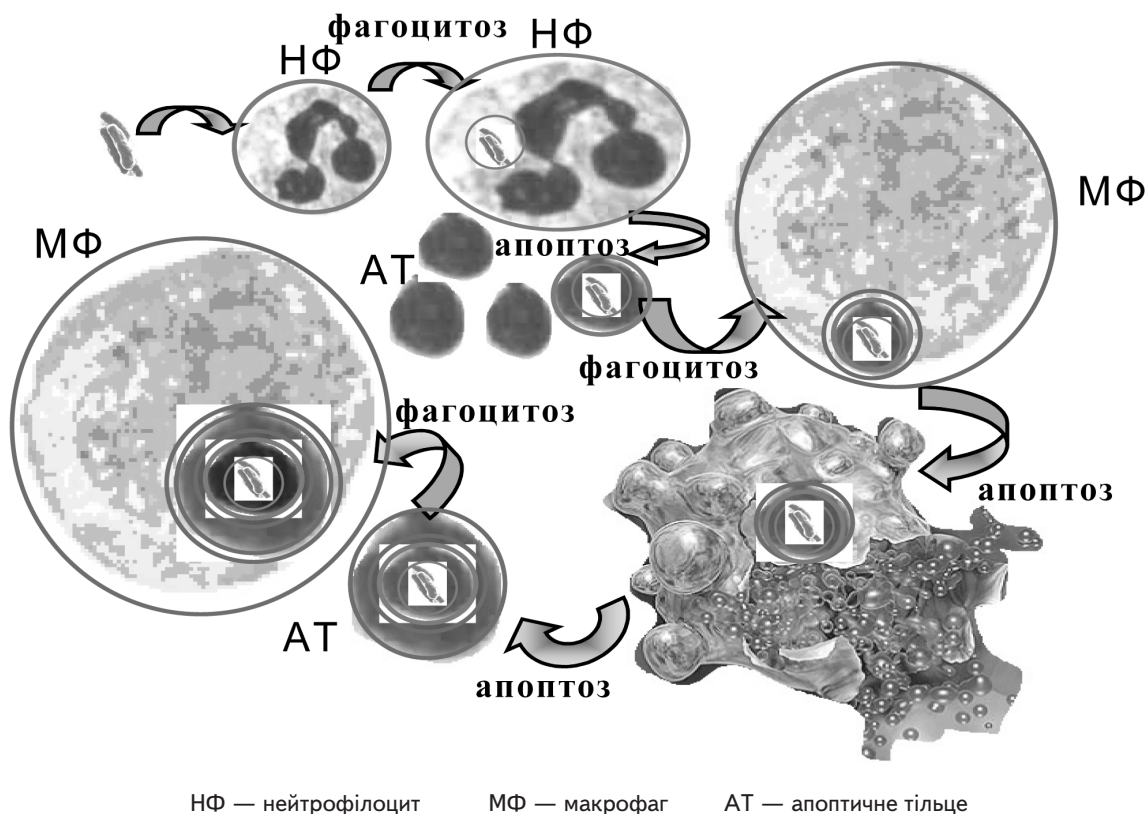


Рис. 1. Механізми персистенції МБТ — упаковка МБТ в багаточарові мембрани фагоцитуючими клітинами при фагоцитозі та апоптозі

скельця піддавали центрифугуванню (5 хвилин при 1000 об/хв.), надсад обережно елімінували, а препарат висушували на відкритому повітрі. Фарбування отриманих в лунках скельць препаратів азур-еозином здійснювали після їх фіксації метанолом та висушування. Облік відсотку Мц та Нф з апоптичною морфологією проводили світловою мікроскопією. Показник індукованого МБТ апоптозу (IA) розраховували за формулою [1]:

$$IA = 100 \cdot VA / BH (\%),$$

де: VA — відсоток фагоцитів з апоптичною морфологією;

BH — бактеріальне навантаження

Статистична обробка отриманих даних була проведена на ПК Intel® Celer з використанням пакету прикладних статистичних програм [3].

Результати та їх обговорення

Аналіз отриманих даних (табл.) показав, що у хворих на туберкульоз легень відбувалося зменшення в 2 рази та більше здатності Нф до поглинання БЦЖ в порівнянні з групою здорових осіб. Крім того, при зменшенні дози БЦЖ зниження показників фагоцитозу мали місце як у хворих на туберкульоз легень, так і в контрольній групі. В той же час адекватної зміни відсотку апоптичних клітин у групі здорових осіб не спостерігалось, а у хворих на ТБ навіть мало місце збільшення цього показника при зменшенні дози мікобактерій (табл.). Порівняння показників апоптозу циркулюючих Нф хворих на туберкульоз легень з аналогічними показниками групи здорових осіб показало, що туберкульозне запалення супроводжується суттєвим (в 2,5 рази) збільшенням рівнів індукованого МБТ апоптозу Нф, яке проявляється при інкубації клітин в дозі 50 мкг/мл та 25 мкг/мл культури БЦЖ.

При вивченні фагоцитозу циркулюючих Мц було встановлено, що у хворих на ТБ легень відбувалося зменшення в 1,5 рази та більше здатності Мц до поглинання БЦЖ (в порівнянні із групою здорових осіб). Також було виявлено, що дозозалежне зменшення показників фагоцитозу в цій групі мало місце лише при скороченні дози БЦЖ до 25 мкг/мл, тоді як достовірних змін цього показника в контрольній групі зафіксовано не було (табл.). У здорових осіб також не було виявлено будь-яких відмінностей як вмісту апоптичних Мц після інкубації цих клітин з різними дозами БЦЖ, так і показників апоптозу Мц, індукованого МБТ. У хворих на ТБ відсоток апоптичних Мц після інкубації з різними дозами БЦЖ виявився достовірно нижчим, ніж у контрольній групі, що обумовило суттєве зростання рівнів індукованого цими мікобактеріями апоптозу Мц. В цій групі обстежених спостерігалась також виражена дозозалежність: чим меншою була інфікованість Мц МБТ, тим вищим виявився індукований ними апоптоз (табл.).

Отже, при ТБ має місце зворотна залежність між інфікованістю циркулюючих фагоцитів МБТ та рівнями індукованого ними апоптозу цих клітин: зменшення дози МБТ, яке супроводжується зниженням їх бактеріального навантаження, призводить до стимуляції процесів програмованої смерті (рис. 2), що, на наш погляд, може мати визначальне значення у формуванні тривалої персистенції та носійства МБТ (при надходженні малих доз цього збудника).

Висновки

При туберкульозі інтенсивність апоптозу фагоцитів, індукованого МБТ, залежить від бактеріального навантаження цих клітин: зменшення інфікованості нейтрофіло-

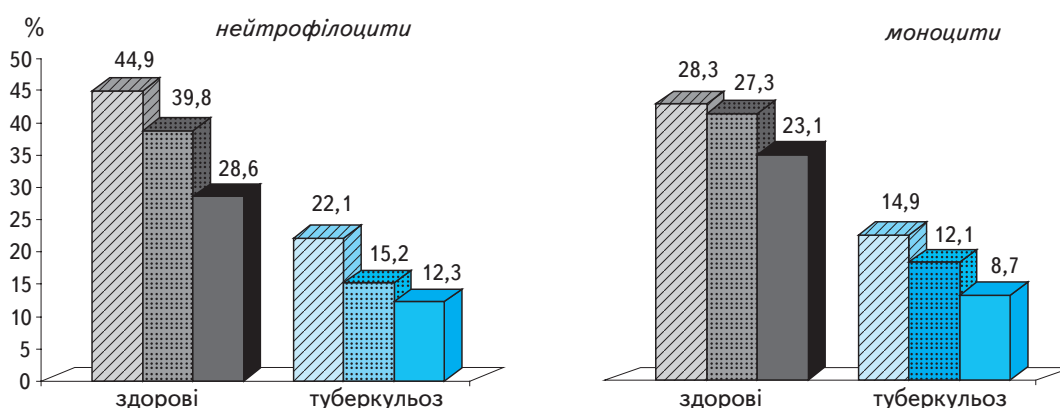
Таблиця

Інфікованість та апоптоз циркулюючих нейтрофілоцитів і моноцитів хворих на туберкульоз легень при їх інкубації з різними дозами БЦЖ (M ± m)

Показники	Здорові особи (n = 15)		Хворі на туберкульоз (n = 15)	
	нейтрофілоцити	моноцити	нейтрофілоцити	Моноцити
<i>Фагоцитоз МБТ:</i>				
– 100 мкг/мл	44,9 ± 3,2	28,3 ± 2,3	22,1 ± 2,4*	14,9 ± 1,7*
– 50 мкг/мл	39,8 ± 3,0	27,3 ± 2,8	15,2 ± 1,6**	12,1 ± 1,1*
– 25 мкг/мл	28,6 ± 1,4#*	23,1 ± 2,8	12,3 ± 1,2**	8,7 ± 0,9***
<i>% апоптичних клітин в пробах з МБТ</i>				
– 100 мкг/мл	54,4 ± 3,0	46,3 ± 2,0	30,4 ± 3,4*	26,3 ± 2,8*
– 50 мкг/мл	47,7 ± 2,4	43,0 ± 2,4	37,2 ± 2,3*	31,7 ± 4,3*
– 25 мкг/мл	53,7 ± 1,9	43,0 ± 2,0	47,6 ± 1,3***	33,1 ± 3,3*
<i>Апоптоз, індукований МБТ</i>				
– 100 мкг/мл	134,4 ± 13,5	180,3 ± 15,0	186,8 ± 25,2	240,4 ± 24,0*
– 50 мкг/мл	132,1 ± 12,8	182,6 ± 20,0	343,0 ± 41,0*	363,5 ± 85,0*
– 25 мкг/мл	194,1 ± 10,1**	218,2 ± 18,4	499,2 ± 66,2*	503,1 ± 75,9**

Примітки. 1. * — різниця показника в порівнянні з показником групи здорових осіб вірогідна (p < 0,05). 2. # — різниця показника в порівнянні з показником тієї ж групи при інкубації клітин з 100 мкг/мл БЦЖ вірогідна (p < 0,05). 3. * - різниця показника в порівнянні з показником тієї ж групи при інкубації клітин з 50 мкг/мл БЦЖ вірогідна (p < 0,05).

ФАГОЦИТОЗ БЦЖ



АПОПТОЗ, ІНДУКОВАНИЙ БЦЖ

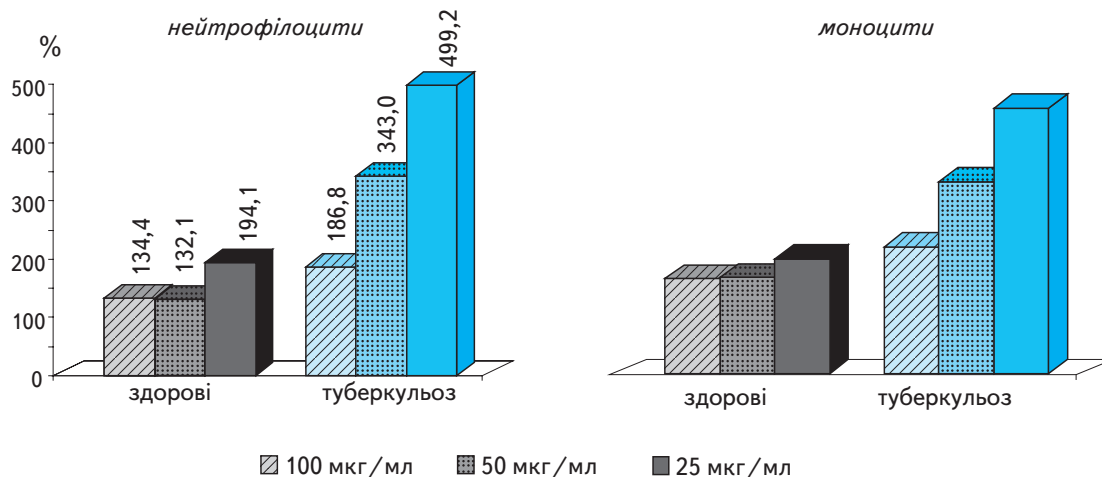


Рис. 2. Вплив різних доз БЦЖ на інфікованість циркулюючих фагоцитів МБТ та індукований ними апоптоз цих клітин у хворих на туберкульоз легень

цитів та моноцитів, яке має місце при надходженні малих доз збудника, призводить до стимуляції процесів програмованої смерті, що сприяє формуванню тривалої мікобактеріальної персистенції.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Апоптоз* нейтрофілоцитів та його роль в патогенезі запальних процесів в легенях туберкульозного та неспецифічного генезу [Текст] / І.Ф. Ільїнська, О.М. Рекалова, Л.В. Ареф'єва та співавт. // Укр. пульмон. журнал. — 2007. — № 2. — С. 32–38.
2. *Ільїнська, І. Ф.* Універсальні мікрокамери на предметних скельцях для інкубації клітин [Текст] / І.Ф. Ільїнська // Лаб. діагностика. — 2008. — № 1 (43). — С. 39–41.
3. *Лапач, С. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — Киев: Морион, 2000. — 320 с.
4. *Apoptosis modulation by mycolic acid, tuberculostearic acid and trehalose 6,6'-dimycolate* [Текст] / I. Nuzzo, M. Galdiero, C. Bentivoglio et al. // J. Infect. — 2002. — V. 44, № 4. — P. 229–235.
5. *Dockrell, D. H.* Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases [Текст] / D.H. Dockrell // J. Infect. — 2001. — V. 42, № 4. — P. 227–234.
6. *Keane, J.* TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following Mycobacterium tuberculosis infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner [Текст] / J. Keane, B. Shurtleff, H. Kornfeld // Tuberculosis (Edinb). — 2002. — Vol. 82, № 2–3. — P. 55.
7. *Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response* [Текст] / J. Nigou, M. Gilleron, M. Rojas et al. // Microbes Infect. — 2002. — V. 4, № 9. — P. 945–953.
8. *P53 expression in cultured blood human monocytes infected with mycobacterial strains.* [Текст] / F. Galletti, E. Bollo, S. Cappia et al. // Panminerva Med. — 2001. — V. 43, № 4. — P. 249–255.
9. *Seah, G.T., Rook G.A.* IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha [Текст] / G.T. Seah, G.A. Rook // J. Immunol. — 2001. — V.167, № 3. — P. 1230–1237.
10. *Weinrauch, Y.* The induction of apoptosis by bacterial pathogens [Текст] / Y. Weinrauch, A. Zychlinsky // Annu. Rev. Microbiol. — 1999. — № 53, — P. 155–187.

ІНФІКОВАНІСТЬ МІКОБАКТЕРІЯМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА ІНДУКОВАНИЙ НИМИ АПОПТОЗ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН ПРИ ТУБЕРКУЛЬОЗІ

І. Ф. Ільїнська, О. М. Зубрійчук

Резюме

Вивчено апоптоз фагоцитуючих клітин, індукований різними дозами МБТ у хворих на туберкульоз легень. Виявлено, що при туберкульозі інтенсивність апоптозу фагоцитів, індукованого МБТ, залежить від бактеріального навантаження цих клітин: зменшення інфікованості нейтрофілоцитів та моноцитів, яке має місце при надходженні малих доз патогена, призводить до стимуляції процесів програмованої смерті, що сприяє формуванню тривалої мікобактеріальної персистенції.

MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION AND INDUCED APOPTOSIS OF PHAGOCYTES

I. F. Ilyinska, O. M. Zubriychuk

Summary

Apoptosis of phagocytes, induced by different doses of MBT, was studied in patients with pulmonary tuberculosis. It was detected, that phagocytes apoptosis intensity depended on bacterial load of these cells: the reduction of neutrophilocytes and monocytes bacterial load resulted in stimulation of programmed death that promoted formation of long-term mycobacterial persistence.