

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В.Я. Гергерт, В.В. Еремеев

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

TO THE MECHANISMS OF REGULATION OF TUBERCULOSIS INFLAMMATION

V. Ya. Herhert, V.V. Ereemeev

В настоящем исследовании рассматривается влияние одного из механизмов регуляции туберкулезного воспаления, а именно сигнала, передаваемого через рецептор (IFNAR1) для интерферонов I типа на течение экспериментального туберкулеза у мышей. На основании изучения особенностей течения заболевания у мышей дикого типа линии 129S2 и Ifnar1-/- мышей на той же генетической основе показано, что сигнал, передаваемый через IFNAR1-рецептор, ухудшает течение экспериментального туберкулеза; не препятствует размножению микобактерий туберкулеза в легких; не оказывает существенного влияния на формирование иммунного ответа на вакцинацию BCG; усиливает приток нейтрофилов в легкие с перераспределением микобактерий в эти клеточные элементы; способствует ускоренному развитию патологии и гибели зараженных мышей.

Ключевые слова: интерферон I типа, экспериментальный туберкулез у мышей, хроническое воспаление

The present study reviewed the role of one of the mechanisms of regulation of tuberculous inflammation, namely, a signal transmitted through the receptor (IFNAR1) for type I interferons in the course of experimental tuberculosis in mice. On the basis of studying of the characteristics of the course of TB in wild-type mice of 129S2 line and Ifnar1-/- mice on the same genetic basis we have shown that the signal transmitted through the IFNAR1-receptor worsens the course of experimental tuberculosis; It don't prevent the proliferation of Mycobacterium tuberculosis in the lungs; It has no impact on the formation of an immune response to the BCG vaccine; It enhances the influx of neutrophils into the lungs with the redistribution of mycobacteria in these cellular elements; It serves to the accelerated development of the pathology and death of infected mice.

Keywords: type 1 interferon, experimental tuberculosis in mice, chronic inflammation

Введение

Известно, что проникновение микобактерий туберкулеза в организм человека вызывает широкий спектр клинических проявлений: от бурно прогрессирующих форм до вяло текущих и ограниченных поражений. Однако в ряде случаев клинические проявления отсутствуют вовсе, и нередко подобные индивидуумы на всю жизнь остаются инфицированными. Необходимо отметить, что последних большинство, и, следовательно, организм человека имеет достаточное количество средств для противостояния репликации микобактерий и развитию заболевания.

Взаимоотношения микро- и макроорганизма при инфицировании микобактериями туберкулеза многогранны и зависят, с

одной стороны, от микобактерий, которые имеют множество генов, контролирующих, в частности, факторы вирулентности, биосинтез клеточной стенки и липидный метаболизм, что обеспечивает их выживание в макрофагах хозяина [2]. С другой стороны, генетический контроль чувствительности и резистентности к микобактериальным инфекциям у человека и животных также носит полигенный характер [4, 9] и затрагивает различные механизмы естественной резистентности и адаптивного иммунного ответа.

Находясь под прессом механизмов врожденного (естественного) иммунитета, а если их оказывается недостаточно, то и развивающегося адаптивного, микобактерии в организме хозяина отчасти погибают, замедляют свой рост, но, по-

видимому, не элиминируются совсем, а переходят в то самое состояние «дормантности», когда они становятся мало восприимчивыми к внешним угнетающим факторам. Механизмы этого перехода до конца неясны, но известно, что в данном процессе участвует множество генов микобактерий: регулона *dosR*, *hspX*, *relA*, ответственные за синтез Rpf-белков и др.

В свою очередь, несмотря на то что механизмы иммунного ответа изучены довольно подробно, хотя, видимо, и не в полной мере, остается все же неизвестным, какое именно сочетание их позволяет сдерживать рост микобактерий в организме и как долго они способны обеспечивать высокий уровень защиты от развития патологических поражений.

Апоптоз зараженных *M. tuberculosis* макрофагов влияет на жизнеспособность микобактерий. Так, индуцированный Fas-лигандом (Fas-L) апоптоз резко уменьшает жизнеспособность вирулентных *M. tuberculosis* H₃₇Rv [1, 3]. В то же время гибель зараженных макрофагов в результате некроза не оказывает существенного влияния на жизнеспособность микобактерий. Более того, у зараженных макрофагов усиливается устойчивость к Fas-L-индуцированному апоптозу и уменьшается экспрессия самого Fas-лиганда. В таких случаях вирулентные микобактерии уходят от этого вида защиты, индуцируя некроз, приводящий к их неконтролируемому размножению в некротизированной ткани.

Следовательно, взаимодействие макрофагов и микобактерий на этом этапе может быть различным. Это было показано в ряде работ: у зараженных макрофагов целостность митохондриальной мембраны, низкая активность каспаз и пониженный выброс митохондриального цитохрома C сопряжены с апоптозом и эффективной антимикобактериальной защитой. Напротив, повреждение митохондриальной мембраны и активация каспаз происходят при некрозе и способствуют размножению микобактерий [8]. Нейтрофилы также способны к апоптозу. Заражение нейтрофилов микобактериями туберкулеза H₃₇Rv и H₃₇Ra вызывает их быструю гибель через апоптоз [5]. Тем не менее нейтрофилы, вошедшие в апоптоз, могут фагоцитироваться макрофагами, что приводит в свою очередь к повышению продукции, например, фактора некроза опухоли – α.

Вместе с тем отмечается существенная роль нейтрофилов во врожденной резистентности к туберкулезной инфекции, и она связана с их способностью продуцировать антимикробные пептиды [7]. Однако было показано также [5], что нейтрофилы сверхчувствительных к туберкулезу мышей линии I/St после заражения микобактериями живут дольше и гораздо менее подвержены Fas-опосредованному апоптозу, чем нейтрофилы резистентных мышей линии A/Sn или C57BL/6. Принимая во внимание слабую способность нейтрофилов подавлять рост микобактерий, оказалось, что в этом случае накопление нейтрофилов в очаге туберкулезного воспаления приводит к развитию прогрессирующей патологии. Именно

у генетически сверхчувствительных к туберкулезу мышей линии I/St после заражения микобактериями происходит повышенное накопление нейтрофилов в легочной ткани, в отличие от резистентных линий, у которых приток клеток в зону поражения более сбалансирован за счет значительного присутствия макрофагов.

Следовательно, у генетически сверхчувствительных к туберкулезу мышей происходит преимущественное накопление полиморфнуклеаров в легочной ткани с утраченной способностью к апоптозу, что приводит к неконтролируемой репликации микобактерий, некрозу, усилению реакций воспаления и распространению патологических поражений с ускоренной гибелью животных.

В настоящем исследовании рассматривается еще один из механизмов, способствующих подобным изменениям, а именно сигнал, передаваемый через рецептор (IFNAR1) для интерферонов I типа. Этот рецептор присутствует на ряде гемопоэтических и резидентных тканевых клеток и запускает каскад процессов с продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов и привлечением клеток в зону воспаления.

Цель исследования

Оценить влияние интерферонов I типа на структуру и интенсивность воспаления при экспериментальном туберкулезе.

Материал и методы

Исследование проводили на мышах линии 129S2 (129S2 WT), высокочувствительной к туберкулезной инфекции, и мышах той же линии, но с нокаутированным геном продукции IFNAR1 – рецептора, воспринимающего сигнал интерферонов I типа (мыши *Ifnar1*^{-/-}). В части экспериментов использовали мышей устойчивой линии – C57BL/6. Животных аэрогенно заражали низкой дозой (200 CFU) микобактерий туберкулеза H₃₇Rv.

Мышей вакцинировали подкожно 106 КОЕ БЦЖ. Заражение производили через 5 недель после вакцинации.

Через четыре недели после заражения у 5 мышей из группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали легкие. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и серийные разведения в стерильном PBS высевали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под бинокулярной лупой через 3 недели после посева на твердый агар.

Для гистологического исследования использовали легкие мышей через 4 недели после заражения. Левую часть легкого фиксировали в 4% параформальдегиде и заключали в парафин. Срезы толщиной 2–3 микрона окрашивали гематоксилин-эозином или по Цилю-Нельсену, как это описано ранее [6]. Для иммуногистологического окрашивания фиксированные и регидратированные срезы обрабатывали раствором для экспозиции антигенов, блокировали белком и инкубировали с

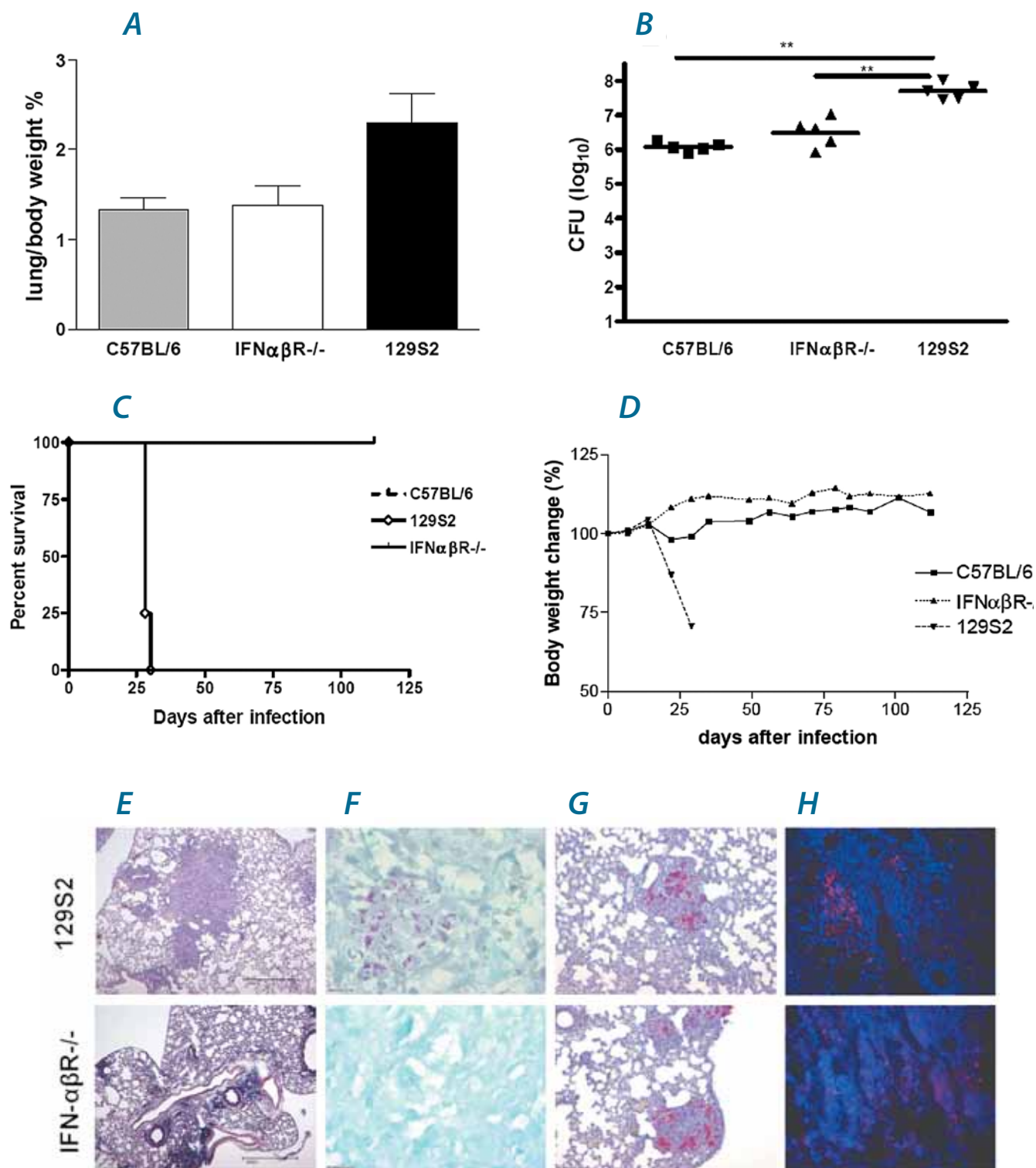


Рис. 1. Сигнал, передаваемый через IFNAR1, ухудшает течение экспериментального туберкулеза.

A – относительный вес легких через 3 недели после заражения.

B – высеваемость МБТ из легких мышей на 21-й день после заражения.

C – кривая выживаемости мышей после аэрозольного заражения вирулентным лабораторным штаммом МБТ H₃₇Rv (200 КОЕ).

D – динамика относительного изменения веса зараженных мышей.

E – гистопатология легких – окрашивание по Гимзе на 21-й день после заражения.

F – окраска на кислотоустойчивые микобактерии в те же сроки.

G – окраска на iNOS – NO-синтетаза (оксиды азота) в те же сроки.

H – иммуноокрашивание на миелопероксидазу.

WT – дикий тип (линия 129S2) и *Ifnar* (-/-) – мыши основной линии 129S2, но с отсутствием гена продукции IFNAR1

первичными антителами, а затем с меченными щелочной фосфатазой козьими антителами против кроличьего иммуноглобулина. Для визуализации щелочной фосфатазы использовали фусцин (DAKO).

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в подушечках лапок мышей определяли, как это описано ранее [6]. Для инъекции использовали 125 IU PPD (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark).

Результаты исследования и обсуждение

На рис. 1 представлены характеристики течения специфического воспалительного процесса в трех группах мышей после аэрогенного заражения низкими дозами микобактерий туберкулеза $H_{37}Rv$ (200 CFU): I группа – высокочувствительной линии 129S2 (WT – дикий тип), II – той же линии, но с нокаутированным геном продукции IFNAR1 ($Ifnar1^{-/-}$) и III – относительно резистентной – C57BL/6. Анализ полученных данных показал, что мыши I группы высокочувствительной линии постепенно теряли вес (рис. 1D), и большинство из них погибли от инфекции в течение 30 дней (рис. 1C). Мыши II и III групп оставались живыми после 100 дней наблюдения (результаты подтверждены в трех независимых экспериментах).

Более высокая сопротивляемость к туберкулезу мышей, нокаутированных по гену продукции IFNAR1, подтверждается и результатами высеваемости МБТ из легких через три недели после заражения по показателям КОЕ на твердых питательных средах, а также гистологическими исследованиями (рис. 1B, E, F) (данные достоверны и подтверждены в пяти независимых экспериментах). У мышей $Ifnar1^{-/-}$ зарегистрирована меньшая выраженность воспалительных поражений в легочной ткани и на срезах легких (рис. 1A, E), а также при окраске на iNOS (NO-синтетаза) (рис. 1G). Последний факт в совокупности с представленными выше данными говорит в этом случае о роли других факторов контроля репликации микобактерий туберкулеза. Иммуногистохимическая окраска на миелопероксидазу (рис. 1H) демонстрирует существенную нейтрофильную инфильтрацию, сопровождающую воспалительный процесс в легочной ткани мышей чувствительной линии. У мышей, нокаутированных по гену продукции IFNAR1, нейтрофильная инфильтрация в легких выражена в существенно меньшей степени.

Следовательно, в условиях отсутствия сигнала через IFNAR1-рецептор $Ifnar1^{-/-}$ мыши приобретали большую степень устойчивости к туберкулезу.

На следующем этапе исследований изучали возможность защиты высокочувствительных к туберкулезу мышей с помощью вакцинации BCG и влияние на этот процесс сигнала через IFNAR1-рецептор (рис. 2).

Как видно на рисунке 2A, подкожное введение живой БЦЖ успешно индуцирует иммунный ответ у мышей дикого типа,

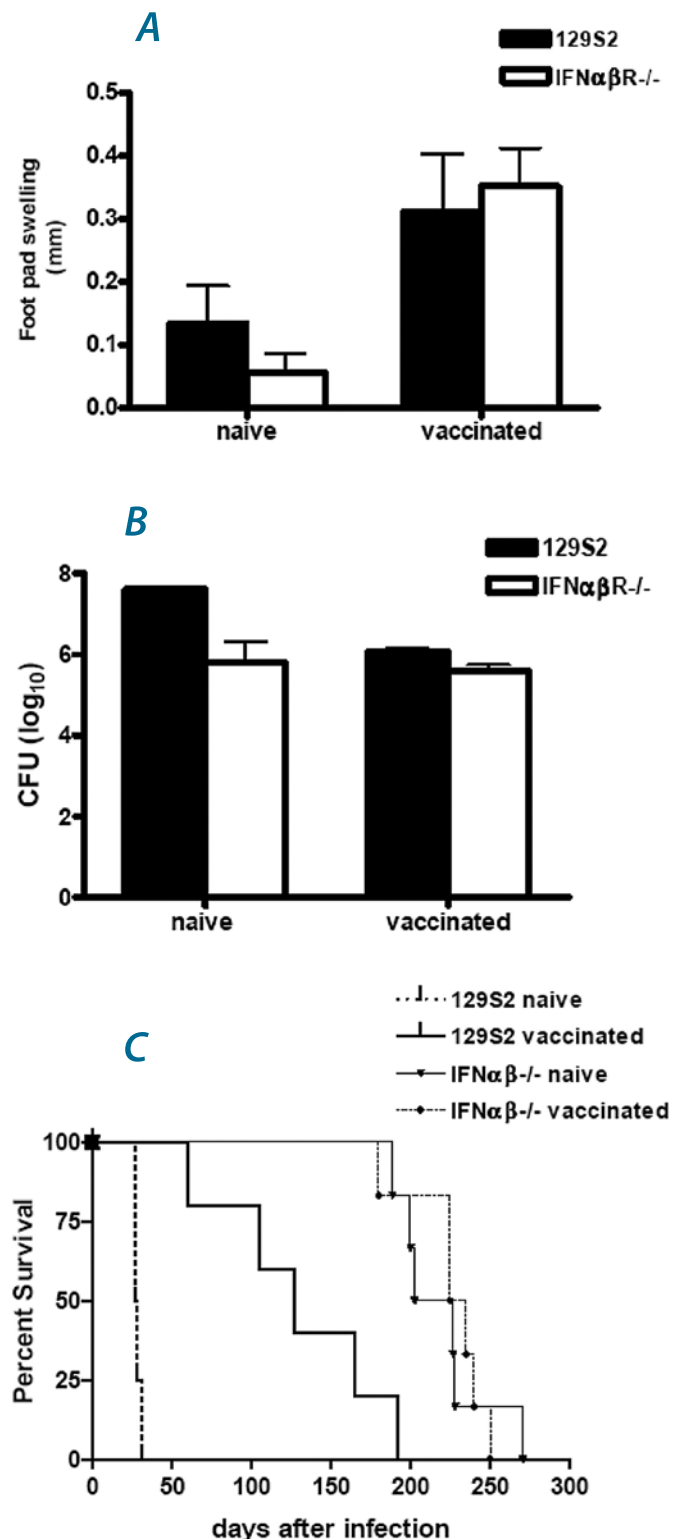


Рис. 2. Вакцинация BCG защищает от туберкулеза мышей чувствительной линии и не влияет на длительность жизни резистентных мышей.

A – реакция ГЗТ (набухание подушечки лапки) на альтернативный у вакцинированных и контрольных мышей.

B – высеваемость МБТ из легких мышей на 21-й день после заражения.

C – кривая выживаемости мышей после аэрозольного заражения вирулентным лабораторным штаммом МБТ $H_{37}Rv$ (200 КОЕ).

и отсутствие рецептора IFNAR1 не способно повлиять на этот процесс. В то же время, несмотря на то что вакцина БЦЖ существенно повышает устойчивость мышей 129S2 к туберкулезу (рис. 2В, С), выживаемость вакцинированных мышей дикого типа после заражения уступает таковой мышей, дефицитных по рецептору к интерферонам первого типа. Наряду с этим вакцинация резистентных *Ifnar1*^{-/-} мышей не увеличивает их выживаемость после заражения (рис. 2С).

Таким образом, представленные результаты подчеркивают негативную роль неконтролируемого воспаления при туберкулезной инфекции.

Выводы

Сигнал, передаваемый через **рецептор для интерферонов**

1 типа:

- ухудшает течение экспериментального туберкулеза;
- не препятствует размножению микобактерий туберкулеза в легких;
- не оказывает существенного влияния на формирование иммунного ответа на вакцинацию BCG;
- усиливает приток нейтрофилов в легкие с перераспределением микобактерий в эти клеточные элементы;
- способствует ускоренному развитию патологии и гибели зараженных мышей.

Литература

1. Behar S., Martin C., Booty M. et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. // *Mucosal. Immunol.* – 2011. – Vol. 4. – P. 279-287.
2. Bellamy R., Hill A. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. // *Current Opinion in Immunology.* – 1998. – Vol. 10. – P. 483-487.
3. Briken V., Miller J. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. // *Future Microbiol.* – 2008. – Vol. 3. – P. 415-422.
4. Comas I., Chakravarti J., Small P. et al. Human T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. // *Nat. Genet.* – 2010. – Vol. 42. – P. 498-503.
5. Eruslanov E., Lyadova I., Kondratieva T. et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 1744-1753.
6. Fremont C., Yermeev V., Nicolle D. et al. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. // *J. Clinical. Investigations.* – 2004.
7. Fu L. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2003. – Vol. 7. – P. 1027-1032.
8. Oberst A., Pop C., Tremblay A. et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 16632-16642.
9. Sanchez F., Radaeva T., Nikonenko B. et al. Multigenic control of disease severity after virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71. – P. 126-131.

Сведения об авторах

Гергерт Владислав Яковлевич – заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-72

e-mail: hergertv@yandex.ru

Еремеев Владимир Витальевич – заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, доктор медицинских наук

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-72