

УДК 616.24-002.5:577.27

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЗАКТИВАЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Хаитова З.К.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

РЕЗЮМЕ

В работе исследованы дендритные клетки, полученные путем трансформации из моноцитов периферической крови. Показаны возможные механизмы нарушений функциональной активности дендритных клеток у больных туберкулезом легких (ТЛ). Установлено, что у больных ТЛ снижается количество клеток, экспрессирующих TLR2, молекулы костимуляции CD86, изменяется секреция цитокина IL-12. Возможно, данные механизмы дезактивации дендритных клеток опосредованы влиянием *M. tuberculosis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дендритные клетки, туберкулез, цитокины, костимуляторные молекулы.

Неспособность иммунной системы защитить организм хозяина от заражения *Mycobacterium tuberculosis* определяется двумя причинами – модуляцией активности иммунокомпетентных клеток самим инфектогеном и исходными (в том числе генетически детерминированными) нарушениями в иммунной системе (до контакта с возбудителем) [1, 6]. В ходе развития и течения туберкулезной патологии у 60–70% больных встречаются различные симптомы вторичной иммунной недостаточности, которая, как правило, является следствием развития инфекционного процесса [2]. Также нельзя не отметить, что заболеванию туберкулезом легких (ТЛ) может способствовать повреждающее действие различного рода болезнетворных факторов на иммунокомпетентные клетки. Иммунный ответ, определяющий дальнейшее течение туберкулезного процесса, развивается в результате первичного контакта инфектогена с антигенпредставляющими клетками (АРС), в роли которых чаще всего выступают дендритные клетки (DC) [3, 4]. Основная функция DC – праймирование Т-лимфоцитов и направление их дифференцировки в Th1-лимфоциты [10]. Однако *M. tuberculosis* способны использовать DC не только как источник дальнейшего распространения в организме, что приводит к хронизации и генерализации инфекции, но также посредством угнетения процессов активации DC изменять дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Th2-клетки [1, 5].

Цель исследования – определить патогенетические факторы дезактивации DC у больных туберкулезом легких.

В исследовании приняли участие 100 больных (80 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 29 до 69 лет (средний возраст пациентов $(42,2 \pm 10,1)$ года) с впервые выявленным туберкулезом легких. Все методы обследования, включая клинический осмотр, сбор анамнеза, физикальные методы, и постановка диагноза осуществлялись в Томской областной туберкулезной клинической больнице. Группа контроля была сформирована из 50 здоровых доноров, сопоставимых с группой больных туберкулезом легких по половозрастным характеристикам.

Для исследования натошак отбиралась кровь из локтевой вены в объеме 20 мл и стабилизировалась гепарином. В последующем мононуклеарные лейкоциты путем центрифугирования в двойном градиенте плотности перколла разделяли на моноцитарную и лимфоцитарную фракции. Моноцитарную клеточную суспензию отмывали средой RPMI-1640 и вносили в плоскодонные 24-луночные планшеты в количестве 1×10^6 клеток в 1 мл. Культивирование и трансформацию моноцитов в миелоидные DC осуществляли в полной питательной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл пенициллина-стрептомицина, 0,29 мкг/мл L-глутамин с добавлением цитокинов (IL-4 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF)) (Sigma, США), при температуре

✉ Хаитова Зульфия Каримкуловна, тел. 8-923-409-3902; e-mail: KhaitovaZ@rambler.ru

37 °С в CO₂-инкубаторе в течение 7 дней. Замена полной питательной среды производилась на 3-и и 5-е сут. Дополнительная стимуляция липополисахаридом (Sigma, США) в концентрации 5 мг/мл осуществлялась на 5-е сут и была необходима для созревания DC. Микроскопическое исследование DC осуществлялось на микроскопе фирмы Carl Zeiss (Германия).

Исследование иммунофенотипа трансформированных зрелых DC проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентными красителями (FITC, PE, PerCP), и изотипических контролей (R&D Systems, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Для определения концентрации цитокинов (IL-12, IL-18) супернатанты DC отбирали на 7-е сут культивирования. Измерение уровня внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB проводили в лизатах зрелых дендритных клеток, также отобранных на 7-е сут культивирования. Концентрацию цитокинов в супернатантах культуральных суспензий и NF-κB в лизатах клеток регистрировали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа в соответствии с методическим рекомендациям фирм-производителей (eBioscience (США), Combo (США)). Регистрацию результатов проводили на фотометре «Multiscan EX» (Thermo, Финляндия).

Обработку полученных результатов выполняли на основе общепринятых статистических методов с помощью программы Statistica 10 for Windows. Оценку нормальности распределения осуществляли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Количественные признаки в группах сравнения не подчинялись нормальному распределению, в связи с чем для парного сравнения выборочных показателей применяли U-критерий Манна–Уитни (для независимых выборок) и критерий Вилкоксона (для зависимых выборок). Вычисляли медиану *Me*, 25%-й и 75%-й квартили для всех количественных признаков в сравниваемых группах. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05 ($p < 0,05$).

В результате проведенного клинико-экспериментального исследования у больных ТЛ было зарегистрировано снижение числа DC, несущих на своей поверхности Толл-подобный рецептор типа 2 (TLR2), в среднем в 2,5 раза по сравнению с этим показателем в группе здоровых доноров (таблица).

Как известно, сигнал от данного рецептора через каскад адаптерных молекул передается на транскрип-

ционный фактор NF-κB, индуцируя транскрипцию его мишеней – генов молекул костимуляции, главного комплекса гистосовместимости (и провоспалительных цитокинов (IL-12, -18, -27 и др.) [7, 8, 11]. Однако в ходе настоящего исследования было обнаружено, что уровень транскрипционного фактора в DC у больных ТЛ не отличался от такового в группе здоровых доноров (таблица).

Имунофенотипические и секреторные свойства миелоидных дендритных клеток, трансформированных из моноцитов периферической крови *in vitro*, у здоровых доноров и больных туберкулезом легких (*Me* (Q_1 – Q_3))

Показатель	Группа	
	Здоровые доноры (<i>n</i> = 50)	Больные туберкулезом легких (<i>n</i> = 100)
TLR2 ⁺ дендритные клетки, %	3,70 (2,95–4,50)	1,50 (0,50–2,10) $p < 0,05$
CD86 ⁺ дендритные клетки, %	60,35 (48,05–71,25)	33,20 (23,40–43,10) $p < 0,05$
NF-κB, %	317,78 (98,89–355,56)	353,33 (298,88–383,33)
Уровень секреции IL-12, пг/мл	16,69 (14,67–20,87)	26,87 (22,52–39,78) $p < 0,05$
Уровень секреции IL-18, пг/мл	31,03 (23,25–34,04)	33,02 (18,62–55,14)

Примечание. *p* – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров.

Вероятно, у больных ТЛ в результате дефицита рецептора TLR2 на DC нарушается внутриклеточная сигнальная трансдукция и последующая активация DC, что проявляется снижением количества DC с фенотипом CD86⁺ по сравнению с таковым в контрольной группе (таблица).

Что касается секреции DCIL-12, то у больных ТЛ она была повышенной по сравнению с показателями у здоровых лиц. Для IL-18 изменений в продукции цитокина у больных ТЛ зарегистрировано не было (таблица).

Возможно, при персистенции *M. tuberculosis* происходит «shedding» (сбрасывание) рецепторов типа TLR2 с поверхности DC, что обуславливает дальнейшую недостаточную в условиях инфекционного процесса внутриклеточную индукцию NF-κB и нарушение экспрессии ко-стимуляторной молекулы CD86. Однако это не согласуется с изменениями секреции IL-12. Можно предположить, что увеличение IL-12-секреторной активности DC носит компенсаторно-приспособительный характер, но механизм его на данном этапе объяснить сложно. Также нельзя не отметить тот факт, что в ходе иммунного ответа и непосредственного праймирования Т-лимфоцитов для последующей их дифференцировки наиболее важны именно кинетические особенности секреции цитоки-

нов – как про-, так и противовоспалительных [9]. Повышение секреции IL-12DC, по всей вероятности, не оказывает достаточного влияния на дифференцировку Т-лимфоцитов в Th1, в результате чего при ТЛ формируется нарушение реакций иммунного Th1-ответа.

Таким образом, у больных ТЛ отмечается нарушение созревания DC и изменения их цитокин-секреторной активности, что (в части иммунофенотипических изменений DC) является следствием недостаточной индукции со стороны TLR2. Возможно, данные нарушения обусловлены как косвенным, так и прямым повреждающим действием возбудителя на антигенпредставляющие клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте РФ для ведущих научных школ (16.120.11.614-НС) и на средства персонального гранта от компании ОПТЭК по поддержке молодых ученых 2012 г. (договор № 8/11 КЦ от 10 апреля 2012 г.).

Литература

1. Есимова И.Е., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Причины дизрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунитета // Бюл. сиб. медицины. 2012. Т. 11, № 3. С. 79–86.
2. Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К. и др. Мононуклеарные клетки периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких // Вестн. РАМН. 2006. № 2. С. 30–34.
3. Свирицкая Е.В., Митрофанов В.С., Шендерова Р.И. и др. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе // Проблемы мед. микологии. 2005. Т. 7, № 1. С. 3–13.
4. Талаев В.Ю. Механизмы управления миграцией дендритных клеток и клеток лангерганса // Иммунология. 2012. № 2. С. 104–112.
5. Уразова О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких // Бюл. сиб. медицины. 2010. Т. 9, № 5. С. 5–13.
6. Шпелькова Г.С., Евстифеев В.В., Анн А.С. Исследования молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза легких на экспериментальных моделях // Туберкулез и болезни легких. 2012. № 7. С. 3–11.
7. Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N. et al. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk // J. of Dental Research. 2011. № 90 (4). P. 417–427.
8. Drage M.G., Pecora N.D., Hise A.G. et al. TLR2 and its coreceptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis* // Cell Immunol. 2009. V. 258 (1). P. 29–37.
9. Merad M., Manz M.G. Dendritic cell homeostasis // Blood. 2009. V. 113 (15). P. 3418–3427.
10. Sabado R.L., Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment [Electronic resource] // Immunotherapy. 2010. V. 2 (1). P. 37–56. Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Directing%20dendritic%20cell%20immunotherapy%20towards%20successful%20cancer%20treatment%20>
11. West M.A., Perscott A.R., Chan K.M. et al. TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent // J. Cell Biol. 2008. V. 182, № 5. P. 993–1005.

Поступила в редакцию 01.12.2012 г.

Утверждена к печати 07.12.2012 г.

Хайтова Зульфия Каримкуловна (✉) – очная аспирантка 3-го года обучения кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

✉ тел. 8-923-409-3902; e-mail: KhaitovaZ@rambler.ru

MOLECULAR MECHANISMS OF DEACTIVATION OF DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Khaitova Z.K.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

We have investigated dendritic cells (DC), obtained by transformation from peripheral blood monocytes. We show the possible mechanisms of infringement of dendritic cells (DC) functional activity in patients with pulmonary tuberculosis (TB). Found that in patients with TB the number of DC, expressing TLR2, costimulation molecules CD86, is reduced, secretion of cytokine IL-12 changes. It is possible the mechanisms of deactivation DC mediated from effects of *M. tuberculosis*.

KEY WORDS: dendritic cells, tuberculosis, cytokines, costimulatory molecules.

Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 139–142

References

1. Yesimova I.Ye., Urazova O.I., Novitsky V.V. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, vol. 11, no. 3, pp. 79–86 (in Russian).
2. Novitsky V.V., Urazova O.I., Strelis A.K. et al. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2006, no. 2, pp. 30–34 (in Russian).
3. Svirshchevskaya Ye.V., Mitrofanov V.S., Shenderova R.I. et al. *Problems of Medical Mycology*, 2005, vol. 7, no. 1, pp. 3–13 (in Russian).
4. Talaev V.Yu. *Immunology*, 2012, no. 2, pp. 104–112 (in Russian).
5. Urazova O.I. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, vol. 9, no. 5, pp. 5–13 (in Russian).
6. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Apt A.S. *Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, no. 7, pp. 3–11 (in Russian).
7. Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N. et al. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk. *Journal of Dental Research*, 2011, no. 90 (4), pp. 417–427.
8. Drage M.G., Pecora N.D., Hise A.G. et al. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol.*, 2009, vol. 258 (1), pp. 29–37.
9. Merad M., Manz M.G. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 2009, vol. 113 (15), pp. 3418–3427.
10. Sabado R.L., Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment [Electronic resource]. *Immunotherapy*, 2010, vol. 2(1), pp. 37–56. Mode of access: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term= Directing %20dendritic%20cell%20immunotherapy%20towards%20successful%20cancer%20treatment%20/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Directing%20dendritic%20cell%20immunotherapy%20towards%20successful%20cancer%20treatment%20/)
11. West M.A., Perscott A.R., Chan K.M. et al. TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent. *J. Cell Biol.*, 2008, vol. 182, no. 5, pp. 993–1005.

Khaitova Zulfiya K., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ Ph. +7-923-409-3902; e-mail: KhaitovaZ@rambler.ru