

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ $CD4^+CD27^{hi}$ И $CD4^+CD27^{lo}$ С МАКРОФАГАМИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ*

Г. С. ШЕПЕЛЬКОВА, К. Б. МАЙОРОВ, В. В. ЕВСТИФЕЕВ, А. С. АПТ

INTERACTION OF T-LYMPHOCYTES OF $CD4^+CD27^{hi}$ AND $CD4^+CD27^{lo}$ WITH MACROPHAGES IN TUBERCULOUS INFECTION IN MICE

G. S. SHEPELKOVA, K. B. MAYOROV, V. V. EVSTIFEEV, A. S. APT

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

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, RF

Защитный иммунный ответ при туберкулезе в значительной степени определяется способностью активированных легочных макрофагов хозяина подавлять рост микобактерий. Активация макрофагов происходит под действием цитокинов и других медиаторов воспаления, в частности $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$, секретируемых Т-лимфоцитами. Существуют две разные популяции эффекторных лимфоцитов $CD4^+CD62L^{lo}CD44^{hi}$, одна из которых имеет поверхностный фенотип $CD27^{hi}$, а другая $CD27^{lo}$. Ранее на модели экспериментальной туберкулезной инфекции было показано, что эти типы клеток различаются по жизнеспособности и по способности продуцировать воспалительные цитокины $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$. Исследовали влияние этих клеток на бактериостатическую активность макрофагов. Показано, что Т-лимфоциты $CD27^{lo}$ намного эффективнее активируют макрофаги и сильнее стимулируют образование активных форм азота. Активирующее действие эффекторов $CD27^{lo}$ наблюдалось даже при соотношении макрофагов к Т-клеткам = 625 : 1. При таком соотношении активные формы азота уже не обнаруживались, что дало возможность предположить наличие второго, нитрит-независимого механизма активации.

Ключевые слова: туберкулез, макрофаги, интерферон- γ , Th-1.

Greatly the protective immune response in tuberculosis is defined by the ability of activated pulmonary macrophages of the host to suppress the mycobacterial growth. Macrophages are activated by the action of cytokines and other inflammatory mediators, in particular $IFN-\gamma$ and $TNF-\alpha$, secreted by T-lymphocytes. There are two different populations of effector lymphocytes of $CD4^+CD62L^{lo}CD44^{hi}$, one of them has the surface phenotype of $CD27^{hi}$, and the other – $CD27^{lo}$. Early the experimental model of tuberculous infection has shown that these types of cells have different vitality and abilities to produce inflammatory cytokines of $IFN-\gamma$ and $TNF-\alpha$. The effect of these cells on bacteriostatic activity of macrophages has been studied. It has been shown that T-lymphocytes of $CD27^{lo}$ are much more efficient activating macrophages and stronger promote formation of active nitrogen forms. Activating action of the effectors of $CD27^{lo}$ was observed even when the ratio of macrophages and T-cells made 625 : 1. With this ratio the active nitrogen forms have not been detected thus one can conclude that there is one more nitrogen independent activation mechanism.

Key words: tuberculosis, macrophages, interferon- γ , Th-1.

Защита организма хозяина от бактериальной инфекции зависит от двух разных типов иммунного ответа – врожденного и адаптивного [5]. Механизмы, обеспечивающие два этих типа защиты, во многом различны, зависят от активности разных типов клеток и запускаются различными путями. Для бактерий с внутриклеточным типом паразитирования многоступенчатые, разнообразные механизмы защиты и патогенеза связаны с тканевыми макрофагами. Эти клетки, с одной стороны, предоставляют патогену нишу для выживания и размножения, а с другой – осуществляют защитные функции и элиминируют бактерии. Это в полной мере относится к такой инфекции, как туберкулез (ТБ). Макрофаги являются ключевыми участниками иммунного ответа, которые ингибируют репликацию микобактерий и отвечают за контроль развития патологии, поддерживая баланс в зоне воспаления (гранулемы). Подавлять рост микобактерий способны только активированные макрофаги.

При ТБ активация макрофагов в основном происходит за счет действия цитокинов и других медиаторов воспаления, в частности $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ [4].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что популяция лимфоцитов-эффекторов $CD4^+CD44^{hi}CD62L^{lo}$, инфильтрирующих легочную ткань при заражении мышей ТБ, состоит из двух основных субпопуляций, $CD27^{hi}$ и $CD27^{lo}$, которые различаются по способности продуцировать $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ [6, 7]. Известно, что дифференцировка лимфоцитов $CD4$ идет в направлении от лимфоцитов $CD27^{hi}$ к лимфоцитам $CD27^{lo}$, и факторы, влияющие на дифференцировку $CD27^{hi} \rightarrow CD27^{lo}$, хорошо изучены [2, 3, 11]. Выяснение относительной роли популяций $CD27^{hi}$ и $CD27^{lo}$ в противотуберкулезном иммунном ответе представляет большой интерес, поскольку может помочь разработать новые подходы к иммуномодуляции.

До настоящего времени оставалось неизвестным, отличаются ли лимфоциты $CD27^{hi}$ и $CD27^{lo}$

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-01358.

по способности активировать макрофаги и стимулировать подавление роста микобактерий. Проведенные исследования позволили получить ответ на этот вопрос.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на мышах линии C57BL/6 (B6), поддерживаемой в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ».

Микобактериальные культуры. В работе использовали микобактерии *M. tuberculosis* штамма H37Rv (Pasteur) из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ». Микобактерии растили в жидкой среде Дюбо (Difco) при 37°C в течение 3 нед., суспендировали в стерильном физиологическом растворе с добавлением 0,05% твина-20 и 0,1% БСА (Sigma, США), ресуспендировали и аликвотировали по 1 мл и хранили при -70°C. Для заражения мышей и постановки экспериментов *in vitro* получали культуры микобактерий, находящихся в фазе логарифмического роста [10]. С этой целью микобактерии размораживали и пассировали в жидкой среде Дюбо (Difco), содержащей 0,5% БСА (2 цикла по 7 дней), переводили в требуемую культуральную среду и фильтровали через фильтры с диаметром пор 5 мкм. Концентрацию микобактерий в полученном фильтрате определяли через 3 сут посредством подсчета микроколоний H37Rv в серийных разведениях фильтрата на агаре Дюбо. В течение этого времени исходную взвесь микобактерий хранили при +4°C [9]. Для индукции экспериментального ТБ мышам внутривенно вводили 10⁵ КОЕ/мышь *M. tuberculosis* H37Rv в 0,1 мл PBS в область ретро-орбитального синуса [1].

Получение суспензии перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги выделяли из экссудата через 5 дней после внутрибрюшинной инъекции 3% пептона. Обогащение макрофагальных клеток осуществляли адгезией макрофагов на чашках Петри для культур клеток млекопитающих. Макрофаги переводили из моно слоя в суспензию раствором Версена, как описано ранее [9].

Выделение высокоочищенных Т-лимфоцитов CD4⁺. Т-лимфоциты CD27^{hi} и CD27^{lo} получали из суспензии клеток селезенки мышей, зараженных вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Выделение проводили методом негативной селекции с помощью сортировки в магнитном поле на бусах фирмы Miltenyi Biotec (Германия) в соответствии с рекомендацией фирмы-производителя [6]. Чистота выделения Т-лимфоцитов CD27^{high} и CD62L^{low}CD27^{high} составляла 98 и 95% соответственно.

Жизнеспособность микобактерий в смешанных культурах оценивали по избирательному включению последними 5,6-[³H]-урацила [9]. Продукцию NO макрофагами оценивали в супернатантах

культур клеток по концентрации одного из химически стабильных продуктов метаболизма азота – нитрит-аниона (NO₂⁻), измеренной с помощью цветовой реакции с реактивом Грисса.

Результаты исследования

Макрофаги перитонеального экссудата мышей линии B6 (5 × 10⁴ клеток/лунку) культивировали *in vitro* в присутствии *M. tuberculosis* и чистых популяций Т-лимфоцитов CD27^{lo} или CD27^{hi} в плоскодонных 96-луночных культуральных планшетах. Соотношение микобактерия–макрофаг в культурах составляло от 1 : 1 до 5 : 1. Т-лимфоциты добавляли в культуру макрофагов в соотношении Т-лимфоцит : макрофаг от 1 : 1 до 1 : 625. Через 72 ч после начала культивирования клеток оценивали жизнеспособность микобактерий по избирательному включению последними [³H]-урацила и продукцию макрофагами NO (рис. 1). Активацию макрофагов под действием Т-лимфоцитов оценивали по степени подавления роста микобактерий в культурах, содержащих Т-лимфоциты, по сравнению с культурами, не содержащими Т-лимфоциты, и по увеличению продукции нитрит-аниона. В качестве положительного контроля использовали культуры зараженных макрофагов, к которым добавляли рекомбинантный IFN-γ.

Без дополнительной стимуляции макрофаги умеренно ограничивали рост микобактерий. Так, при соотношении микобактерия : макрофаг – 5 : 1 подавление роста составляло 30-35%. Добавление в культуру макрофагов высокой дозы рекомбинантного IFN-γ (100 ед/мл) вызывало существенное подавление роста микобактерий (до 80%). Подобно IFN-γ, добавление к макрофагам Т-лимфоцитов CD27^{lo} или CD27^{hi} вызывало активацию макрофагов

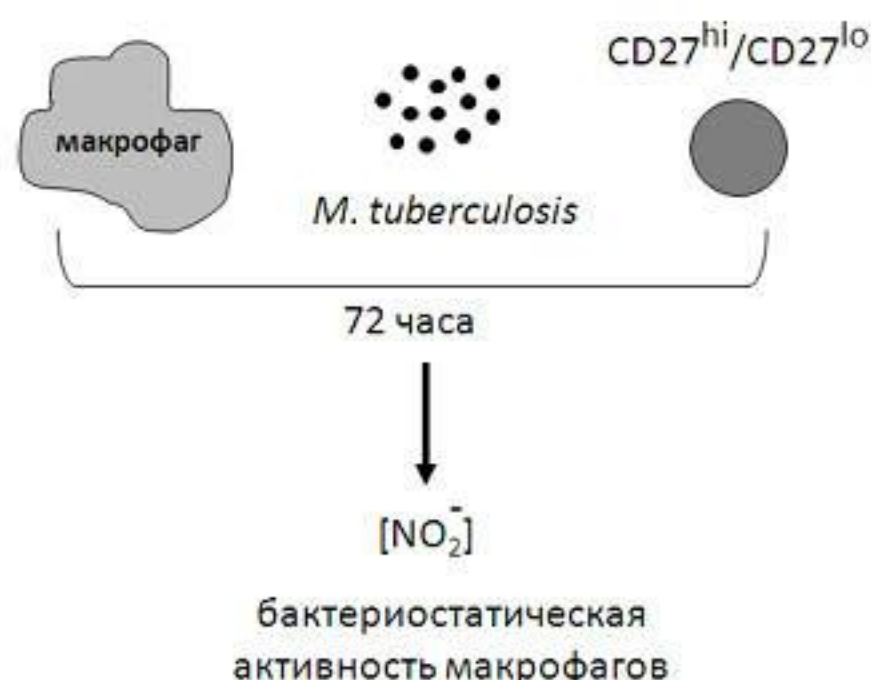


Рис. 1. Схема совместного культивирования макрофагов перитонеального экссудата с микобактериями и Т-лимфоцитами CD4⁺

и значительное снижение жизнеспособности микобактерий. При высоком содержании Т-лимфоцитов в культурах (соотношения Т-лимфоцит : макрофаг от 1 : 5 до 1 : 25) обе субпопуляции Т-клеток вызвали подавление жизнеспособности микобактерий макрофагами, о чем свидетельствует снижение уровня включения $[^3\text{H}]$ -урацила микобактериями (рис. 2). Однако при снижении количества Т-лимфоцитов, добавляемых в культуру, выявлены различия между исследуемыми популяциями. В культурах, содержащих лимфоциты $\text{CD}27^{\text{hi}}$ в соотношении Т-клетка : макрофаг – 1 : 125, включение $[^3\text{H}]$ -урацила микобактериями было достоверно выше, чем в культурах, содержащих Т-клетки $\text{CD}27^{\text{lo}}$. Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$ были способны активировать бактериостатическое действие макрофагов даже при соотношении Т-клетка : макрофаг – 1 : 625, то есть единичные лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$ способны существенно подавлять рост поглощенных макрофагами микобактерий.

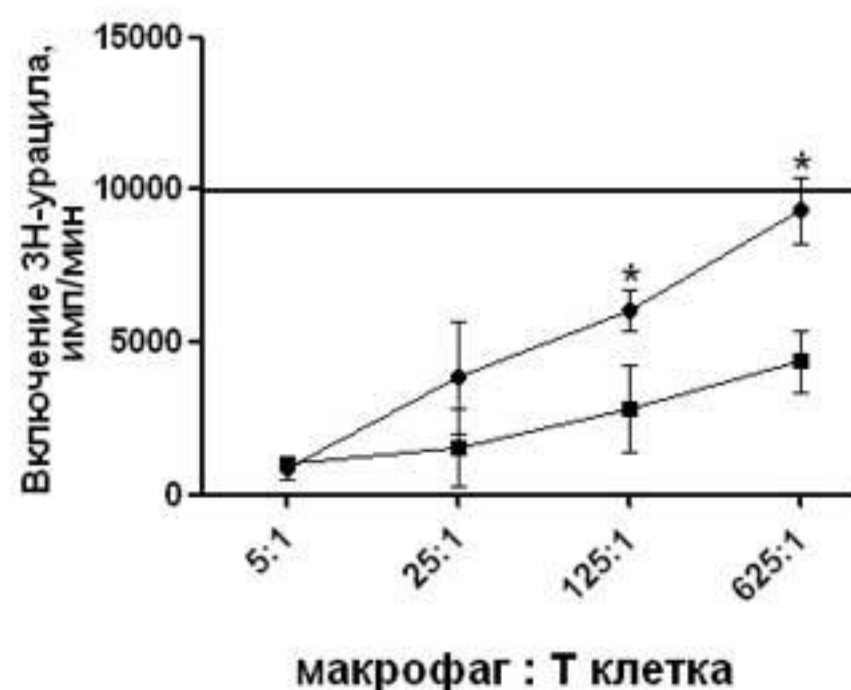


Рис. 2. Подавление роста микобактерий перитонеальными макрофагами. (■) – макрофаги + Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$; (●) – макрофаги + Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{hi}}$. Горизонтальная прямая – подавление роста микобактерий макрофагами без дополнительного стимула (контроль). На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов ($M \pm SD$, $n = 3$ в группе). * – достоверное отличие между группами

Активные формы азота NO , NO_2 и HNO_2 – это важнейшие эффекторные молекулы, подавляющие рост микобактерий в макрофагах, а их продукция макрофагами в значительной степени стимулируется $\text{IFN-}\gamma$ [8]. В связи с этим представляло интерес исследовать уровень продукции метаболитов азота макрофагами, активированными двумя различными популяциями Т-клеток.

Перитонеальные макрофаги обнаруживают незначительную спонтанную секрецию нитрит-аниона, которая не изменяется при добавлении

в культуру микобактерий ($3,4 \pm 0,8$ и $3,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ соответственно). $\text{IFN-}\gamma$ оказывал сильное стимулирующее действие на продукцию нитрит-аниона макрофагами вне зависимости от присутствия или отсутствия микобактерий ($58,4 \pm 3,0$ и $45,2 \pm 5,6 \mu\text{M}$ соответственно). При добавлении Т-лимфоцитов в соотношении Т-лимфоцит : макрофаг – 1 : 5 наблюдалась существенная стимуляция продукции нитрит-аниона (рис. 3). При снижении количества Т-лимфоцитов, добавляемых в культуру, были выявлены различия между клетками $\text{CD}27^{\text{hi}}$ и $\text{CD}27^{\text{lo}}$. Так, при соотношении Т-лимфоцит : макрофаг от 1 : 25 до 1 : 125 лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$ стимулировали продукцию активных форм азота, в то время как активирующее действие лимфоцитов $\text{CD}27^{\text{hi}}$ исчезало (рис. 3).

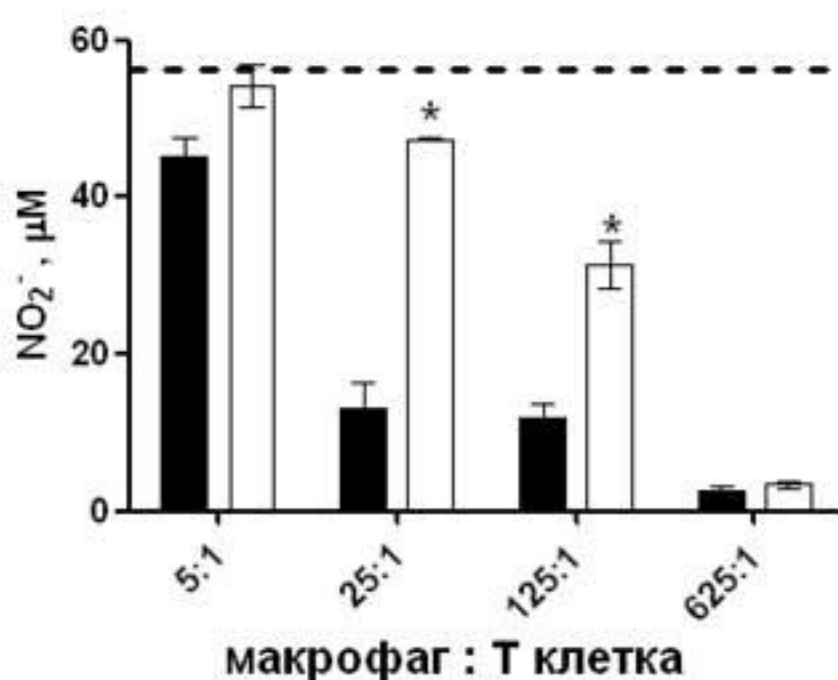


Рис. 3. Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$ эффективнее активируют макрофаги. Перитонеальные макрофаги культивировали в присутствии микобактерий и различного количества Т-лимфоцитов $\text{CD}27^{\text{hi}}$ и $\text{CD}27^{\text{lo}}$. Через 72 ч культивирования оценивали секрецию (NO_2^-). (□) – макрофаги + Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$; (■) – макрофаги + Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{hi}}$. Пунктиром показано количество (NO_2^-), образуемое при культивировании макрофагов с микобактериями и $\text{IFN-}\gamma$ (100 Ед/мл). На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов ($M \pm SD$, $n = 3$ в группе). * – достоверное отличие между группами

Закключение

Таким образом, Т-лимфоциты $\text{CD}27^{\text{lo}}$ более активно стимулировали образование активных форм азота. Кроме того, они активировали бактериостатическое действие макрофагов даже при соотношении макрофаг : Т-клетка – 625 : 1, при котором активные формы азота уже не обнаруживались. Это дает основание предположить наличие иного, не зависящего от активных форм азота, механизма активации макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Apt A. S., Avdienko V. G., Nikonenko B. V. et al. Distinct H-2 complex control of mortality, and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice // *Clin. Exp. Immunol.* – 1993. – Vol. 94, № 2. – P. 322-329.
2. Arens R., Tesselaar K., Baars P. A. et al. Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion // *Immunity*. – 2001. – Vol. 15, № 5. – P. 801-812.
3. Brown G. R., Meek K., Nishioka Y. et al. CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8 $^{+}$ T lymphocytes // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154, № 8. – P. 3686-3695.
4. Flynn J. L., Chan J., Lin P. L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis // *Mucosal. Immunol.* – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 271-278.
5. Hoffman J. A., Kafatos F., Janeway Jr. C. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – P. 1313-1318.
6. Kapina M. A., Shepelkova G. S., Mischenko V. V. et al. CD27 low CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27 high precursors *in situ*, produce IFN- γ , and protect the host against tuberculosis infection // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 2. – P. 976-985.
7. Lyadova I. V., Oberdorf S., Kapina M. A. et al. CD4 T cells producing IFN- γ in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 138, № 1. – P. 21-29.
8. MacMicking J. D., North R. J., LaCourse R. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1997. – Vol. 94. – P. 5243-5248.
9. Majorov K. B., Lyadova I. V., Kondratieva T. K. et al. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent *Mycobacterium tuberculosis*: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, № 2. – P. 697-707.
10. Nikonenko B. V., Averbakh M. M., Lavebratt C. et al. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice // *Tuber. Lung Dis.* – 2000. – Vol. 80. – P. 15-25.
11. Rowley T. F., Al-Shamkhani A. Stimulation by soluble CD70 promotes strong primary and secondary CD8 $^{+}$ cytotoxic T cell responses *in vivo* // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, № 10. – P. 6039-6046.
2. Arens R., Tesselaar K., Baars P. A. et al. Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion. *Immunity*, 2001, vol. 15, no. 5, pp. 801-812.
3. Brown G.R., Meek K., Nishioka Y. et al. CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8 $^{+}$ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, no. 8, pp. 3686-3695.
4. Flynn J.L., Chan J., Lin P.L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal. Immunol.*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 271-278.
5. Hoffman J.A., Kafatos F., Janeway Jr.C. et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, vol. 284, pp. 1313-1318.
6. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Mischenko V.V. et al. CD27 low CD4 T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27 high precursors *in situ*, produce IFN- γ , and protect the host against tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 2, pp. 976-985.
7. Lyadova I.V., Oberdorf S., Kapina M.A. et al. CD4 T cells producing IFN- γ in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 138, no. 1, pp. 21-29.
8. MacMicking J.D., North R.J., LaCourse R. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, pp. 5243-5248.
9. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K. et al. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent *Mycobacterium tuberculosis*: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 2, pp. 697-707.
10. Nikonenko B.V., Averbakh M.M., Lavebratt C. et al. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *Tuber. Lung Dis.*, 2000, vol. 80, pp. 15-25.
11. Rowley T.F., Al-Shamkhani A. Stimulation by soluble CD70 promotes strong primary and secondary CD8 $^{+}$ cytotoxic T cell responses *in vivo*. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 10, pp. 6039-6046.

REFERENCES

1. Apt A.S., Avdienko V.G., Nikonenko B.V. et al. Distinct H-2 complex control of mortality, and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1993, vol. 94, no. 2, pp. 322-329.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Шепелькова Галина Сергеевна
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,
г. Москва, Яузская аллея, д. 2
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Поступила 03.07.2015