

УДК 616.24-002.5-097:577.27.016

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОФЕНОТИПА И ЦИТОКИНСЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Хаитова З.К., Уразова О.И., Воронкова О.В., Хасанова Р.Р., Новицкий В.В.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, e-mail: KhaitovaZ@rambler.ru

В статье приведены результаты исследования иммунофенотипа (TLR2, CD80, CD86) и цитокинсекреторной (IL-12, IL-18) активности дендритных клеток (DC) *in vitro*, трансформированных из моноцитов периферической крови в полной культуральной среде под влиянием специфических (интерлейкин 4 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и неспецифических (липолисахарид) стимуляторов, у больных с впервые выявленным туберкулезом легких. В ходе исследования показано, что у больных туберкулезом легких имеет место нарушение процесса созревания DC, что проявляется снижением количества клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD86, изменением секреции DC *in vitro* провоспалительного цитокина – IL-12, однако изменений секреции синергичного ему цитокина IL-18 обнаружено не было. При этом также наблюдается повышение количества DC, несущих на своей поверхности молекулы костимуляции CD80. Предполагается, что данные процессы связаны с недостаточной индукцией DC в ходе взаимодействия с *Mycobacterium tuberculosis* и дальнейшего распознавания в виду дефицита на клетках рецепторов типа TLR2, что в свою очередь может являться следствием как прямого, так и косвенно-го влияния инфектогена на антигенпредставляющие клетки иммунной системы.

Ключевые слова: дендритные клетки, молекулы костимуляции, толл-подобные рецепторы, цитокины, туберкулез

FEATURES AND IMMUNOPHENOTYPE CYTOKINE SECRETORY ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Khaitova Z.K., Urazova O.I., Voronkova O.V., Hasanova R.R., Novitsky V.V.

Siberian state medical university, Tomsk, e-mail: KhaitovaZ@rambler.ru

This paper presents the results of studies the results of studies of immunophenotype (TLR2, CD80, CD86) and cytokine secretion (IL-12, IL-18) activity of dendritic cells (DC) *in vitro*, transformed from peripheral blood monocytes in complete culture medium under the influence of specific (interleukin 4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), and nonspecific (lipopolysaccharide) stimulants in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. It is shown that in patients with pulmonary tuberculosis has been a violation of the process of maturing DC, which manifested by reduced number of cells expressing CD86, change DC *in vitro* secretion of proinflammatory cytokines – IL-12, however, it changes the secretion of synergistic cytokine IL-18 were not founded. In this case also there is an increase of DC, bearing on its surface costimulation molecule CD80. It is assumed that these processes are related to the lack of induction of DC during interaction with *Mycobacterium tuberculosis* and further recognition in mind deficit cells receptors of TLR2, which in turn may be the result of both direct and indirect effects on antigen-presenting cells of immune system from tuberculosis bacteria.

Keywords: dendritic cells, costimulation molecules, toll-like receptors, cytokines, tuberculosis

Как известно из литературных источников, презентация антигена антигенпредставляющими клетками является ключевым этапом в формировании адекватного иммунного ответа. В результате контакта между антигенпредставляющей клеткой и Т-лимфоцитом образуется «иммунологический синапс», одна из функций которого заключается в активации клеток-эффекторов и запуске секреции цитокинов, поляризующих иммунный ответ. Так, известно, что наиболее часто в роли антигенпредставляющих клеток выступают дендритные клетки (DC) [12, 13, 17]. В литературных источниках [11, 13] подробно описаны морфофункциональные особенности DC, но в контексте туберкулезной патологии имеются единичные и разрозненные данные, которые не описывают полной картины их участия в иммунопатогенезе туберкулеза легких.

DC несут на своей поверхности широкий спектр мембранных рецепторов, в частности, относящиеся к семейству TLRs (toll-likereceptors). Данное семейство рецепторов включает 13 представителей, способных связывать высокомолекулярные паттерны в структуре различных микроорганизмов: липополисахариды (ЛПС), белки, гликопротеины и др. При взаимодействии TLR со своим лигандом запускается процесс димеризации рецептора, в результате чего сигнал передается на внутриклеточные адаптерные белки: MyD88 (myeloiddifferentiationfactor 88), TIRAP (TIRdomain-containingadaptorprotein), TRIF (TIR-domain-containingadaptor-includingIFNfi) и TRAM ((TRIF)-relatedadaptormolecule). Активация адаптерных белков в конечном итоге приводит к активации транскрипционного фактора NF-kB, который, транслоцируясь в ядро,

индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, фактора некроза опухолей α (TNF α), хемокины), костимуляторных молекул (CD80, CD86, CD83), молекул гистосовместимости (HLA класса II) [1, 2, 3, 7, 19].

Касательно туберкулезной инфекции, распознавание липоарабиноманнана клеточной стенки микобактерий туберкулеза DC осуществляется с помощью TLR типа 2 (TLR2), в результате чего инициируется процесс внутриклеточной трансдукции сигнала и запускается противотуберкулезный иммунный ответ [4, 18]. Связывание микобактериального паттерна сопряжено с процессом созревания DC, в результате чего теряется их способность к эндо- и пиноцитозу, но при этом увеличивается экспрессия на поверхности CD80, CD86, HLA класса II. Перечисленные молекулы необходимы для формирования иммунологического синапса с Т-лимфоцитом и активации последнего, в том числе посредством секреции DC провоспалительных цитокинов – IL-12 и IL-18 [13].

Наиболее важной функцией IL-12 является поляризация дифференцировки наивных Т-хелперов (Th0) в направлении Т-хелперов типа 1 (Th1) с последующей секрецией ими интерферона γ (IFN γ). Таким образом, происходит отрицательная селекция Th2-лимфоцитов и формирование иммунного ответа по Th1-типу. Однако для продукции IFN γ Т-клетками необходимо синергичное влияние двух цитокинов: IL-12 и IL-18. Механизм синергичности опосредован реципрокной стимуляцией экспрессии рецепторов к IL-12 и IL-18, то есть каждый из цитокинов стимулирует экспрессию рецептора другого цитокина на поверхности клетки. Более того, рецептор к IL-18 представлен только на Th1-лимфоцитах, что определяет его основным ростовым и дифференцировочным фактором для данного типа клеток [8, 14].

В ходе изучения иммунопатогенеза туберкулезной инфекции ранее нами было показано, что в его основе лежат анергия Т-лимфоцитов и поляризация иммунного ответа в направлении Th2-реакций [6]. Было сформулировано предположение, что данные нарушения происходят по причине недостаточной активации Т-лимфоцитов в процессе их взаимодействия с антигенпредставляющими клетками, в частности, DC [10, 12].

В этой связи, целью настоящего исследования явилось изучить у больных туберкулезом легких иммунофенотипические и функциональные свойства дендритных клеток, характеризующие их способности к индукции иммунного ответа.

Материалы и методы исследования

В группу обследуемых лиц было включено 100 больных с впервые выявленным туберкулезом легких в возрасте от 39 до 60 лет (средний возраст пациентов – 42 ± 10 лет). Клинический осмотр, сбор анамнеза, физикальные методы обследования и постановка диагноза осуществлялись в Томской областной туберкулезной клинической больнице. Группу здоровых доноров составили 50 человек, сопоставимых с группой больных туберкулезом легких по половозрастным характеристикам.

Для последующей трансформации в DC мононуклеарные лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови, забранной из локтевой вены в объеме 20 мл утром натощак, путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина; между собой фракции моноцитов и лимфоцитов разделяли путем центрифугирования в двойном градиенте плотности перколл. Моноцитарную клеточную взвесь отмывали средой RPMI-1640 и вносили в плоскостонные 24-луночные планшеты в количестве $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Культивирование осуществляли в полной питательной среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 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 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 7 дней. Замена полной питательной среды производилась на 3-и и 5-е сутки. На 5-е сутки культуральную клеточную суспензию дополнительно стимулировали липополисахаридом в концентрации 5 мг/мл («Sigma», USA). Микроскопическое исследование DC осуществлялось на микроскопе фирмы CarlZeiss (Германия). С помощью микроскопа CarlZeiss оценивались морфологические изменения моноцитов при трансформации их в DC (в частности, наблюдалось снижение адгезионных свойств моноцитов и последующее формирование групп клеток в питательной среде; формирование отростков DC) [15]. Иммунофенотипирование трансформированных зрелых DC проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител CD86, CD80 TLR2, меченных соответственно флуоресцентными красителями (FITC, PE, PE), и изотипических контролей («R&D Systems», США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD Cell Cell Quest for Mac OS® X.

Концентрацию цитокинов (IL-12, IL-18) определяли в супернатантах DC на 7-е сутки культивирования путем иммуноферментного анализа (eBioscience, США).

Обработку полученных результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью программы Statistic for Windows Version 10. Для оценки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Поскольку исследованные количественные признаки в группах сравнения не подчинялись нормальному распределению для попарного сравнения выборочных показателей применяли критерии U Манна-Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Для всех количественных признаков в сравниваемых группах вычисляли медиану, 25 и 75%-й квартили. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что количество DC, экспрессирующих TLR2, у больных туберкулезом легких оказалось в 2,5 раза ниже, чем в группе здоровых доноров (таблица). Как указывалось выше, данный рецептор отвечает за связывание с липоарабиноманном микобактерий туберкулеза и запускает последующую сигнальную трансдукцию, необходимую для полноценного созревания DC и формирования антимикобактериального иммунного ответа. [3, 9]. Следовательно, можно предположить, что в результате

дефицита TLR типа 2 на DC нарушается взаимодействие клеток с возбудителем и цепь последующих за этим процессов.

Данное предположение подтверждается тем, что дефицит TLR2⁺DC у больных туберкулезом легких сочетался со снижением количества клеток, несущих на поверхности плазматической мембраны молекулу костимуляции CD86. Так, в группе больных туберкулезом легких относительное содержание CD86⁺ клеток было в 1,8 раза ниже нормы (таблица). Известно, что отсутствие активационного сигнала от костимуляторной молекулы CD86 DC опосредует нарушение активации и анергию Т-лимфоцитов. [5, 13].

Имунофенотипические и функциональные особенности миелоидных дендритных клеток, трансформированных из моноцитов периферической крови *in vitro*, у здоровых доноров и больных туберкулезом лёгких, Me (Q1-Q3)

Параметры	Группа исследования	
	Здоровые доноры (n = 50)	Больные туберкулезом легких (n = 100)
Количество TLR2 ⁺ дендритных клеток, %	3,70 (2,95–4,50)	1,50 (0,50–2,10) p ₁ < 0,05
Количество CD86 ⁺ дендритных клеток, %	60,35 (48,05–71,25)	33,20 (23,40–43,10) p ₁ < 0,05
Количество CD80 ⁺ дендритных клеток, %	1,30 (0,82–1,91)	3,60 (3,00–5,60) p ₁ < 0,001
Уровень секреции IL-12, пг/мл	16,69 (14,67–20,87)	26,87 (22,52–39,78) p ₁ < 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.

Что касается другой молекулы костимуляции – CD80, то у больных туберкулезом легких количество несущих ее DC было, напротив, в 2,8 раза выше по сравнению с таковым у здоровых доноров (таблица). Однако показано, что связывание CD80 DC с рецептором на клетке-эффекторе является более значимым в процессе отторжения аллотрансплантата и противоопухолевой, нежели противомикробной защиты [9].

Одной из важных характеристик степени зрелости DC и их активационного статуса является секреция клетками IL-12 и IL-18. В ходе эксперимента было показано, что секреция IL-12 DC у больных ТЛ была повышенной в 1,6 раза относительно значений в группе здоровых доноров. При этом уровень продукции IL-18 DC не претерпевал выраженных отклонений от нормы (таблица). Возможно, повышение секреции провоспалительного IL-12 DC носит компенсаторно-приспособительный характер в связи с недостаточной активацией Т-лимфоцитов

со стороны молекул костимуляции DC или характерным для туберкулеза дефицитом на Т-клетках взаимодействующих с ними рецепторами (CD28) [7]. Схожие данные были получены M.L. Ollerose et al. [2007], показавшими в эксперименте на трансгенных мышах, инфицированных возбудителем туберкулеза, повышение секреции IL-12, которое, однако, по заключению авторов, не влияло на образование гранулемы, дифференцировку Т-лимфоцитов в Th1-клетки, секрецию INF γ и элиминацию патогена.

Заключение

Полученные результаты позволяют предполагать, что штаммы микобактерий туберкулеза способны ингибировать первый этап противотуберкулезного иммунного ответа, заключающийся в их связывании DC и представлении микобактериального антигена клеткам-эффекторам. Ведущими патогенетическими факторами нарушений индуктивной фазы иммунного ответа при

туберкулезе легких являются дефицит на DC рецепторов типа TLR2 и молекул костимуляции CD86. Очевидно, что нарушение созревания и дисфункция DC являются результатом как прямого действия инфицирующего агента на процесс генерации DC из моноцитов периферической крови DC, так и следствием нарушений механизма трансдукции сигнала рецептор- и цитокинзависимой активации клеток [7; 20].

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

Список литературы

1. Бережная Н.М. Toll-подобные рецепторы как физиологические регуляторы врожденного и приобретенного иммунитета / Н.М. Бережная, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 187–190.
2. Ганковская О.А. Взаимодействие вирусов и Toll-подобных рецепторов / О.А. Ганковская, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 2. – С. 101–105.
3. Двойственная роль толл-подобных рецепторов в регуляции противоопухолевого иммунитета / И.О. Чикилева, А.В. Караулов, Н.Ю. Анисимова и др. // Иммунология. – 2010. – № 1. – С. 52–55.
4. Маянский А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунологические аспекты) / А.Н. Маянский // Иммунология. – 2001. – № 2. – С. 53–63.
5. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 3. – С. 42–50.
6. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1–2. – С. 119–126.
7. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунитета / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–86.
8. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2008. – Т. 85, № 3. – С. 31–35.
9. Сепиашвили Р.И. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике / Р.И. Сепиашвили, И.П. Балмасова // Молекулярная медицина. – 2008. – № 7. – С. 14–22.
10. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 183–186.
11. Талаев В.Ю. Механизмы управления миграцией дендритных клеток и клеток лангерганса // Иммунология. – 2012. – № 2. – С. 104–112.
12. Уразова О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких / О.И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 5–13.
13. Хоченков Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2 // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 307–313.
14. Якушенко Е.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе / Якушенко Е.В., Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 355–364.
15. Leon B. Monocyte-derived dendritic cells / B. Leon, M.L. Bravo, C. Ardavin // Seminars in Immunology. – 2005. – Vol. 17. – P. 313–318.

16. Interleukin-12p40 overexpression promotes interleukin-12p70 and interleukin-23 formation but does not affect bacille Calmette-Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* clearance / M. L. Olleros, D. Vesin, E. Martinez-Soria // Immunology. – 2007. – Vol. 122, № 3. – P. 350–361.
17. Merad M. Dendritic cell homeostasis / M. Merad., M.G. Manz // Blood. – 2009. – Vol. 113(15). – P. 3418–3427.
18. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis* / M.G. Drage, N.D. Pecora A.G. Hise et al. // Cell Immunol. – 2009. – Vol. 258(1). – P. 29–37.
19. Toll-like Receptor 2 and DC-SIGNR1 Differentially Regulate Suppressors of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection / V. Srivastava, M. Manchanda, S. Gupta et al. // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284(38). – P. 25532–25541.
20. Sakamoto, K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection / K. Sakamoto // Infectious Disease. – 2012. – Vol. 49(3). – P. 423–429.

References

1. Berezhnaya N.M., Sepiashvili R.I. Allergology and Immunology, 2011, Vol. 12, no 2. pp. 187–190.
2. Gankovskaya O.A., Zverev V.V. Journal of Epidemiology and Microbiology, Immunobiology, 2010, no 2. pp. 101–105.
3. Chikileva I.O., Sentries A.V., Anisimov N.Y. Immunology, 2010, no. 1. pp. 52–55.
4. Mayansky A.N. Immunology, 2001, no 2. pp. 53–63.
5. Urazova O.I., Novitsky V.V., Churina E.G. Byulleten sibirskoi mediciny, 2010, no. 3, pp. 42–50.
6. Churina E.G., Novitsky V.V., Urazova O.I. Medical Immunology, 2012, Vol. 14, no 1 2. pp. 119–126.
7. Urazova O.I., Novitsky V.V., Voronkova O.V. Vestnik Urabskoi medicinskoi akademicheskoi nauki, 2010, no. 4, pp. 104–107.
8. Hasanova R.R., Voronkova O.V., Urazova O.I. Tuberkulez i bolezni legkih, no. 3, pp. 31–35.
9. Sepiashvili R.I., Balmasov I.P. Molekulyarnaya medicina, 2008, no. 1, pp. 14–22.
10. Churina E.G., Novitsky V.V., Urazova O.I. Byulleten sibirskoi mediciny, 2011, no. 4, pp. 183–186.
11. Talaev V.J. Immunology, 2012, no 2, pp. 104–112.
12. Urazova O.I. Byulleten sibirskoi mediciny, 2010, no. 5, pp. 5–13.
13. Hochenko D.A. Biologicheskie membrany, 2010, no. 4, pp. 307–313.
14. Yakushenko E.V., Lopatnikov Y.A., Sennikov S.V. Medical Immunology, 2005, Vol. 7, no 4. pp. 355–364.
15. Leon B., Monocyte-derived dendritic cells / B. Leon, M.L. Bravo, C. Ardavin // Seminars in Immunology. 2005. Vol. 17. pp. 313–318.
16. Interleukin-12p40 overexpression promotes interleukin-12p70 and interleukin-23 formation but does not affect bacille Calmette-Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* clearance / M. L. Olleros, D. Vesin, E. Martinez-Soria // Immunology. 2007. Vol. 122, np. 3. pp. 350–361.
17. Merad, M. Dendritic cell homeostasis / M. Merad., M. G. Manz // Blood. 2009. Vol. 113(15). pp. 3418–3427.
18. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis* / M.G. Drage, N.D. Pecora A.G. Hise et al. // Cell Immunol. 2009. Vol. 258(1). pp. 29–37.
19. Toll-like Receptor 2 and DC-SIGNR1 Differentially Regulate Suppressors of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection / V. Srivastava, M. Manchanda, S. Gupta et al. // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284(38). pp. 25532–25541.
20. Sakamoto, K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection / K. Sakamoto // Infectious Disease. 2012. Vol. 49(3). pp. 423–429.

Рецензенты:

Кологривова Е.Н., д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г.Томск;
Зима А.П., д.м.н., профессор кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России г. Томск.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.