

## **ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА ПРИ ТУБЕРКУЛЁЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

### **Третьяк Екатерина Владиславовна**

студент, Крымская медицинская академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», РФ, г. Симферополь

### **Кальфа Маргарита Алексеевна**

ассистент кафедры патологической анатомии с секционным курсом, Крымская медицинская академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», РФ, г. Симферополь

### **Голубинская Елена Петровна**

кандидат мед. наук, доц. кафедры патологической анатомии с секционным курсом, Крымская медицинская академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», РФ, г. Симферополь

## **Features of apoptosis in tuberculous inflammation**

### ***Ekaterina Tretyak***

*Student, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Russia, Simferopol*

### ***Margarita Kalfa***

*assistant of the Department of pathological anatomy with sectional course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Russia, Simferopol*

### ***Elena Golubinskaya***

*candidate of med. D., associate Professor of chair of pathologic anatomy with sectional course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Russia, Simferopol*

**Аннотация.** Особую актуальность, по нашему мнению, приобретает изучение процессов инициации и реализации апоптоза при различных формах туберкулезной инфекции (ТБ), как одной из топовых причин летальности населения по всему миру. В иммунопатогенезе ТБ тесно взаимосвязаны

механизмы врождённого и приобретённого иммунитета, осуществляемых различными клеточными и неклеточными компонентами, прежде всего клетками гистиоцитарного происхождения и различными субпопуляциями лимфоцитов. Парадокс иммунного ответа на микобактерии туберкулеза заключается в одновременной активации и анергии иммунокомпетентных клеток вследствие формирования «порочного круга».

**Abstract.** Of particular relevance, in our opinion, the study of the processes of initiation and implementation of apoptosis in various forms of tuberculosis infection (TB) as one of the top causes of mortality of the population worldwide. In the immunopathogenesis of TB are closely interrelated mechanisms of innate and acquired immune system by various cellular and non-cellular components, particularly cell gistiotitarnaya origin and various subpopulations of lymphocytes. The paradox of the immune response to Mycobacterium tuberculosis is the simultaneous activation and anergy of immune cells due to the formation of "vicious circle".

**Ключевые слова:** апоптоз; маркеры; туберкулёз; макрофаг; лимфоцит; нейтрофил.

**Keywords:** apoptosis; markers; tuberculosis; macrophage; lymphocyte; neutrophil.

Апоптоз – это запрограммированная асинхронная гибель клеток, которая обеспечивает физиологическое равновесие и генетическую стабильность организма [21, с. 119-120]. Несмотря на то, что процессы апоптоза имеют в основном физиологическую направленность, в современных научных исследованиях доказана его роль как одного из факторов дисрегуляции иммунного ответа при различных заболеваниях, в том числе при злокачественных новообразованиях, иммунодефицитных состояниях и т. д. [18, с. 62-77]. Особую актуальность, по нашему мнению, приобретает изучение процессов инициации и реализации апоптоза при различных формах туберкулезной инфекции, как одной из топовых причин летальности населения по всему миру [1, с. 8-15].

Общеизвестно, что в иммунопатогенезе ТБ тесно взаимосвязаны механизмы врождённого и приобретённого иммунитета, осуществляемых различными клеточными и неклеточными компонентами [16, с. 480].

Макрофаг представляет собой один из ключевых элементов первой линии защиты организма от инфекций. Однако, роль клеток гистиоцитарной природы в развитии туберкулёзного воспаления неоднозначна. С одной стороны они выполняют фагоцитарную и антигенпредставляющую функцию. Макрофаги непосредственно подавляют рост бактерий, фагоцитируют их, помимо этого участвуя в широком спектре реакций клеточного противотуберкулёзного иммунитета, путём презентации антигена, индуцируя накопления Т-лимфоцитов в очаге воспаления и т. д. А с другой – являются основным источником патогена в организме [21, с. 120]. Несостоятельность фагоцитарной активности является следствием многих процессов, таких как нарушения функции компонентов комплемента сыворотки крови, генетическая или приобретенная аномалия гранул макрофагов, а также неспособностью гранул выделить свой секрет в фагосомы. Также полноценный фагоцитоз не наступает

вследствие высокой кислотоустойчивости клеточной стенки микобактерий. Особую роль в этом процессе играет способность микобактерий продуцировать токсичные вещества (гликолипиды), которые повреждают макрофаги и препятствуют завершению фагоцитоза. При благоприятных условиях *M. tuberculosis* могут искажать деятельность лизосом макрофага, что приводит к избыточной активности лизосомальных ферментов [12, с. 520].

Распознавание макрофагами возбудителей туберкулёза происходит при помощи TLR (toll-подобных рецепторов) [28, с. 910-918]. Основным лигандом для TLR на поверхности микобактерий является арабиноманан, который распознаётся TLR2 и TLR4. Для возбудителей ТБ макрофаги являются "средой обитания" [2, с. 122]. В результате незавершенного фагоцитоза *M. tuberculosis* оказываются внутри клетки и становятся защищенными как от антител, так и от цитотоксических Т-лимфоцитов. Возбудители ТБ персистируют внутри эндосом макрофагов после их фагоцитирования [8, с. 39]. Биогенез фагоцитоза и фаголизосом является процессом, который необходим для удаления патогенна и дальнейшей обработки и представления иммунным клеткам антигенов [14, с. 3-13]. Формирование фагосомы запускает запрограммированный процесс созревания фаголизосомы, который контролируют ионы кальция и регуляторы движения органелл вокруг малых связывающих белков Rabs ('Ras-related in brain') из семейства GTP (гуанозинтрифосфатаз). Микобактерии ТБ нарушают Rab-контролируемое движение мембран, тем самым препятствуя созреванию фагосомы. Этот процесс, именуемый «арест созревания фаголизосом», является критичным для выживания *M. Tuberculosis*. Микобактерии туберкулёза, подавляя активность лизосомальных ферментов, активно размножаются внутри клетки и становятся, таким образом, причиной острого инфекционного процесса [14, с. 3-13]. Способность макрофагов подавлять возбудителей туберкулёза, зависит от генетической устойчивости, которая ассоциирована с геном *bcg* [22, с. 81-85]. Этот ген кодирует макрофагальный белок Nramp 1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) связанный с естественной устойчивостью макрофагов к 22 внутриклеточным патогенам. Этот белок, может транспортировать двухвалентные ионы металлов, которые приводят к подавлению роста *M. Tuberculosis* внутри клеток. У человека дефект Nramp 1 ассоциирован с развитием туберкулеза лёгких. Помимо этого фагоцитоз микобактерий происходит с участием трансмембранного рецептора класса SRA / CD204 (scavenger receptor class, рецептор класса «сборщик»), участвующий в распознавании патогенной инфекции [27, с. 55]. Этот белок действует как рецептор распознавания образов (PRR), способный связывать широкий диапазон лигандов, включая химически модифицированные или измененные молекулы, компоненты бактериальной поверхности, апоптотические клетки и эндогенные молекулы опасности, такие как стресс-белок. Полное подавление патогенна происходит через 20-24 часа, спустя 6-12 часов после завершения фагоцитоза.

Помимо макрофагов, апоптозу при ТБ подвержены и нейтрофилы, которые также взаимодействуют с патогенами, распознавая полисахариды галактоманан и арабиноманан на поверхности клеточной стенки при помощи TLR2 и TLR4 [10, с. 25]. Основным механизмом их защиты является продукция перекисных радикалов кислорода и дегрануляция. Сериновая протеаза, входящая в состав гранул фагоцитов, является основным веществом, повреждающей клеточную стенку патогенна. [25, с. 281-283]. Заражение нейтрофилов человека микобактериями туберкулеза вызывает их быструю гибель при помощи апоптоза [13, с. 3-7]. Этот процесс связан с повышением продукции проапоптотического белка Bax, стимулирующий выброс цитохрома С в цитоплазму, путём формирования каналов в мембране митохондрий. При этом сам цитохром С связывается с Araf-1 (адапторная молекула связывающаяся с цитохромом С) и активирует каспазный механизм индуцирования апоптоза. Одновременно с этим процессом происходит снижением продукции противоапоптотического белка Bcl-xL ингибирующего высвобождение цитохрома С. После вхождения в апоптоз, нейтрофилы могут фагоцитироваться макрофагами, которые тем самым повышают продукцию провоспалительного цитокина TNFα [23, с. 1367-1376]. Одним из представителей семейства TNF является поверхностный растворимый белок FAS/CD95 (CD – cluster differentiation) или APO-1, который содержит одиночную трансмембранную область и приводит к гибели клеток путем связывания FAS с FAS-лигандом, приводя к FAS-опосредованному апоптозу [10, с. 84]. Усилить нейтрофил-опосредованную реакцию могут такие клетки как тромбоциты, тучные, эпителиальные клетки, базофилы и эозинофилы, за счет связывания через TLR рецепторы и оказывая, таким образом, повреждающее действие на патогены за счет продукции белка дефензина [30, с. 697-701]. Эти катионные белки присоединяются к клеточной мембране

микроба и углубляются в неё, формируя порообразные разрывы. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что апоптоз инфицированных нейтрофилов представляет собой важный защитный механизм, приводящий к избирательному удалению зараженных клеток из очага воспаления, который помимо этого усиливает функциональную активность тканевых макрофагов.

Специфический протективный ответ при ТБ также ассоциирован с активацией Th1 (Т-хелперы 1, T-helper-1-cell) [29, с. 6]. Их функция заключается в активации макрофагов, которые при этом «ожидают» специфический сигнал, заключающийся в выделении CD4+ Т-клетками воспаления INF- $\gamma$  (интерферон гамма) [24, с. 19-204]. Цитотоксические Т-клетки становятся активными сразу после распознавания антигена, они реализуют потенциальную готовность молекулярного аппарата к уничтожению клеток-мишеней при помощи апоптоза или некроза [20, с. 39-43]. Напротив, CD4+ Т-клетки воспаления после распознавания антигена на поверхности макрофагов тратят большее количество времени на синтез медиаторов, активирующих макрофаги. Вновь синтезированные цитокины, собранные в микровезикулы, проникают в макрофаги в месте контакта с Т-клетками [29, с. 6].

В макрофагах, активированных посредством контакта с Т-клетками воспаления и в результате секреции INF- $\gamma$ , инициируется ряд биохимических процессов, которые обеспечивают этим клеткам сильные антибактериальные свойства. В условиях взаимодействия макрофагов с Т-клетками наблюдается более эффективное слияние фагосом, разрушающих внутриклеточные патогены. Процесс фагоцитоза сопровождается кислородным взрывом, заключающимся в образовании кислородных радикалов и окиси азота, обладающих выраженной бактерицидной активностью. В условиях стимуляции TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$  этот процесс идет гораздо активнее. Кроме того, активированные макрофаги усиливают экспрессию молекул II класса МНС и рецептора TNF- $\alpha$ , что приводит к вовлечению в процесс дополнительных наивных Т-клеток.

Т-клетки воспаления, взаимодействуя с макрофагами, не только способствуют усилению внутримакрофагальных биохимических процессов, но при этом сами активируются, выступая в роли организаторов многостороннего иммунного ответа на антиген. Макрофаги, хронически инфицированные внутриклеточными бактериями, могут терять способность активироваться Т-клетками. [9, с. 54-57]. Массовое включение в процесс новых макрофагов происходит при высвобождении патогенов под влиянием синергического действия на инфицированные клетки TNF- $\beta$  (лимфотоксина) и INF- $\gamma$  – продуктов активированных CD4+ Т-клеток воспаления [19, с. 53-58].

В условиях мобилизации иммунного ответа, пул эффекторных Т-клеток должен поддерживаться на высоком уровне [17, с. 51-59].

Активированные макрофагами Т-клетки воспаления вовлекают дополнительные эффекторы посредством IL-2 (interleukin, интерлейкин), который способствует пролиферации и дифференцировке антигенспецифических Т-клеток. Набор цитокинов, продуцируемый активированными CD4+ Т-клетками воспаления после специфического распознавания патогена, обеспечивает многопрофильное развитие клеточного иммунного ответа [10, с. 28].

В основе иммунного дисбаланса при туберкулезной инфекции также, лежит неэффективность антигенспецифического иммунного Th1 (Т-хелперы 1, T-helper-1-cell) – ответа [3, с. 194]. Спонтанный апоптоз CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup> Т-лимфоцитов коррелирует с потерей ИФН- $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток, специфичных к *M. tuberculosis*.

CD8+ Т-лимфоциты также выполняют важную защитную функцию при туберкулезном воспалении. Механизмы антимикробного действия таких клеток могут реализовываться при помощи синтеза различных цитокинов (интерферон-гамма, фактор некроза опухоли), а также пептидов, обладающих бактерицидным действием на микобактерии туберкулёза, находящихся в макрофагах [26, с. 1479-1489].

Продолжительный контакт специфических Т-клеток с микобактериями в очагах инфекции может запускать порочный круг: иммунная активация и потеря отвечающих на антиген Т-клеток происходят параллельно, что приводит к персистенции туберкулезной инфекции [8, с. 38-43].

Динамика воспаления при туберкулезе может выражаться как в регрессии, так и в росте гранулем, помимо этого она может привести к образованию казеоза. Макрофаги, окружающие участок казеоза синтезируют проапоптотический белок Вах [15, с. 128]. Большая часть Т-лимфоцитов, находящихся в этой зоне, активированы и вырабатывают как провоспалительный цитокин ИФН- $\gamma$ , так и фактор апоптоза FasL. Все это указывает на то, что формирование казеоза непосредственно связано с индуцированной активацией гибели Т-клеток [13, с. 5].

Учитывая описанное выше, можно сделать вывод о том, что парадокс иммунного ответа на микобактерии туберкулеза заключается в одновременной активации и анергии иммунокомпетентных клеток. Таким образом, формируется определенный «порочный круг»: токсины *M. Tuberculosis* способствуют метаболическим нарушениям в клетках Т-клеточного и макрофагального звеньев иммунного ответа, что, в свою очередь, приводит к системному мембраноповреждающему эффекту и повышенному их апоптозу. Это создает отрицательное влияние на клеточное взаимодействие в системе «макрофаг — CD4+ лимфоцит — макрофаг». В результате данных нарушений формируется выраженный иммунодефицит, заключающийся в неспособности иммунокомпетентных клеток оказывать должное сопротивление инфекции, по причине чего они гибнут в большом количестве. Это, в свою очередь, ведет к бурному и массивному размножению популяции микобактерий туберкулёза и прогрессированию туберкулезного процесса.

### **Список литературы:**

1. Абдуллаев Р.Ю., Каминская Г.О., Комисарова О.Г. Бактерицидная активность легочных и циркулирующих фагоцитов при туберкулёзе лёгких // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2014. – № 12. – С. 8-15.
2. Бердюгина О.В., Скорняков С.Н., Медвинский И.Д., Ершова А.В., Павлов В.А., Бердюгин К.А. Функционально-метаболические изменения иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 02 (107). С. 122.
3. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К. Иммуно-патология туберкулеза легких. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – С. 194.
4. Голубинская Е.П., Зоркин Е.К. Роль различных методов биопсии в диагностике туберкулезного процесса // Синергия Наук. – 2017. – № 8. – С. 540-545.
5. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Зинченко А.А. Зависимость склеротических процессов от макрофагальной активности при фиброзно-кавернозном туберкулезе // Синергия Наук. – 2017. – № 8. – С. 527-532. – <https://elibrary.ru/item.asp?id=28358731>.
6. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Зинченко А.А. Распределение количества альвеолярных макрофагов и особенности их функциональной активности в различных участках легочной ткани при фиброзно-кавернозном туберкулезе // Синергия Наук. – 2017. – № 8. – С. 533-539. – <https://elibrary.ru/item.asp?id=28358732>.
7. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кальфа М.А., Белоус В.В., Потапина Е.С. Морфологические особенности диссеминированного туберкулеза легких при ко-инфекции ВИЧ/туберкулёз // Концепт. – 2017. – Т. 42. – С. 120-123.
8. Горлова Е.Е. Патология иммунитета при туберкулёзе // Бюллетень. – 2010. – № 35. – С. 38-43.
9. Еремеев В.В., Майоров К.Б. Взаимодействие макрофаг-микобактерия в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию // Проблемы туберкулеза. – 2002; 3: 54-57.
10. Ершова А.В. Функциональная активность фагоцитов и популяционный состав иммунокомпетентных клеток крови у больных туберкулёзом: дис. ... канд. биолог. наук. –

Челябинск, 2017. – С. 25.

11. Кальфа М.А., Филоненко Т.Г. Морфологические особенности диссеминированного туберкулёза легких на фоне ВИЧ-инфекции в зависимости от степени угнетения иммунитета // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16., № 4 (64). – С. 65-69.

12. Перельман М.И. Фтизиатрия: учебная литература для студентов медицинских вузов. / М.И. Перельман, В.А. Корякин, И.В. Богадельникова. – 3-е изд. – М.: Медицина. – 2004. – С. 520.

13. Пичугин А.В., Апт А.С. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулёзной инфекции // Проблемы туберкулёза. – 2005. – № 12. – С. 3-7.

14. Свирщевская Е.В., Митрофанов В.С., Шендерова Р.И., Чужова Н.М. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 3-13.

15. Сибиряк С.В., Капулер О.М., Курчатова Н.Н., Каут Д.А., Юсупова Р.Ш., Нелюбин Е.В. Апоптоз и иммунная система // Медицинский вестник Башкортостана, 2006. – 1. – С. 127-132.

16. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2011. – 480 с.: ил.

17. Хонина Н.А. Апоптоз лимфоцитов возможный механизм нарушения антигенспецифического ответа при туберкулезе легких / Н.А. Хонина, Л.В. Сахно, М.Н. Норкин [и др.] // Медицинская иммунология. – СПб. : РО РААКИ. – 2001. – Т. 3. – № 1. – С. 51-59.

18. Цыган В.Н. Роль апоптоза в регуляции иммунного ответа // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2004 – Т. 3. – № 2. – С. 62-77.

19. Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г. Противотуберкулезный иммунитет. Часть I. Український пульмонологічний журнал. – 2010. – № 4. – С. 53-58.

20. Чернушенко Е.Ф. Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких / Е.Ф. Чернушенко, Л.П. Кадан, О.Р. Панасюкова [и др.] // Украинский пульмонологический журнал. – Киев. – 2010. – № 2 – С. 39-43.

21. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Филинюк О.В., Теплова Н.В., Есимова И.Е. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом лёгких с множественной лекарственной устойчивостью к M. Tuberculosis // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14. – № 1-2. – С. 119-120.

22. Buu N. The Bcg Host-Resistance Gene / N. Buu, F. Sanchez, E. Schurr // Clinical Infectious Diseases. – 2000. – № 31(3). – P. 81-85.

23. Cho H. Recombinant guinea pig tumor necrosis factor $\alpha$  stimulates the expression of interleukin-12 and the inhibition of Mycobacterium tuberculosis growth in macrophages / H. Cho, T.M. Lasko // Infect. Immun. – 2005. – № 73 (3). – P. 1367-1376.

24. Cooper A.M. The role of cytokines in the initiation, expansion and control of cellular immunity to tuberculosis / A.M. Cooper, S.A. Khader // Immunological Reviews. – 2008. – № 226 (1). – P. 191-204.

25. Danelishvili L. Inhibition of the Plasma-Membrane Associated Serine Protease Cathepsin G by Mycobacterium Tuberculosis Rv3364c Suppresses Caspase-1 and Pyroptosis in Macrophages / L. Danelishvili, L.J. Everman, J.M. Mc Namara [et al.] // Front. Microbiol. – 2012. – № 2. – P. 281-283.

26. Kamath A.B. Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after Mycobacterium tuberculosis infection / A.B. Kamath, J. Woodworth, X. Xiong [et al.] // The J of Exp. Med. – 2004. – № 200 (11). – P. 1479-1489.

27. Mazurek J. Divergent effects of Mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells / J. Mazurek, L. Ignatowich, G. Kallenius [et al.] // PLoS One. -2012. - № 7(8): 42515.
28. Noss E.H., Pai R.K., Sellati T.J. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis J. Immunol. - 2001; 167: 910-918.
29. Ocejo-Vinyals J.-Gonzalo, Lavín-Alconero Lucía, Sánchez-Velasco Pablo et al. Mannose-binding lectin promoter polymorphisms and gene variants in pulmonary tuberculosis patients from Cantabria (Northern Spain) Pulm. Med. - 2012; 2012: 6.
30. Rivas-Santiago B. b-Defensin Gene Expression during the Course of Experimental Tuberculosis Infection / B. Rivas-Santiago, E. Sada, V. Tsutsumi [et al.] // J of Infect Dis. - 2006. - № 194 (5). - P. 697-701.