

А. В. ПИЧУГИН, А. С. АПТ

АПОПТОЗ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва

Апоптоз — это широко распространенная и четко охарактеризованная форма гибели клеток. Смерть отдельных клеток зачастую полезна в интересах всего организма. В качестве примеров можно привести гибель короткоживущих фагоцитирующих клеток (таких, как нейтрофилы); элиминацию аутореактивных Т-клеток; гибель клеток при недостатке факторов роста; гибель "отживших свое" типов клеток при эмбриональной и постэмбриональной дифференцировке; убийство клеток-мишеней Т-клетками или естественными киллерами (NK-клетками), антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность.

Апоптоз часто отождествляют с запрограммированной клеточной гибелью, что не совсем верно [15]. У позвоночных смерть клетки может быть допустимой и даже предсказуемой, но не запрограммированной в том смысле, какой применим для смерти индивидуальных клеток беспозвоночных. У беспозвоночных можно в некоторых случаях предсказать с очень высокой точностью смерть для каждой отдельно взятой клетки, т. е. она действительно запрограммирована [27, 52]. Напротив, во время развития популяции В-лимфоцитов около 95% клеток погибает в результате апоптоза [22] в силу разных причин (неправильная реаранжировка генов, экспрессия рецептора к аутоантигенам или отсутствие стимуляции), но невозможно предсказать заранее точную судьбу каждой конкретной клетки.

Ответ хозяина на инфекцию традиционно изучался в таких проявлениях, как антимикробная активность молекул (антитела, комплемент, активные формы кислорода и азота) и иммунокомпетентных клеток (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы). Открытие апоптоза эукариотических клеток позволило начать изучение совершенно новых аспектов взаимодействия паразит—хозяин и сыграло уникальную роль в понимании процессов, происходящих в инфицированных микроорганизмами клетках хозяина и отвечающих клетках иммунной системы [47].

Сразу после открытия самого феномена апоптоза это явление удалось зарегистрировать при помощи световой микроскопии в клетках гранулем при лепре, саркоидозе и туберкулезе. Использование электронной микроскопии доказало наличие апоптотических тел в специфических гранулемах при туберкулезе и лепре [17]. Множество данных свидетельствует о том, что *M. tuberculosis* вызывает гибель некоторых популяций Т-клеток и предотвращает гибель макрофагов с нарушенными бактерицидными и антигенпрезентирующими функциями, вероятно, служащих местом для длительного персистирования микобактерий [72]. Переходя к более подробному описанию апоптоза при туберкулезной инфекции, следует, однако, подчеркнуть разное значение апоптотической гибели двух важнейших при туберкулезной инфекции популяций клеток: Т-лимфоцитов и макрофагов.

Апоптоз моноцитов и макрофагов при туберкулезной инфекции. Точно установлено, что микобактерии, как и другие внутриклеточные паразиты, индуцируют образование антигенспецифических CD4⁺ [36] и CD8⁺ [42] цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способны элиминировать нагруженные микобактериями макрофаги, запуская в них механизм апоптоза. Считается, что цитотоксические Т-лимфоциты из обоих пулов — CD4⁺ и CD8⁺ — играют важную роль при элиминации внутриклеточных инфекций. Было показано, что специфичные к ППД Т-клетки человека с фенотипом CD4⁺ вызывают апоптоз обработанных этим же антигеном моноцитов, макрофагов и В-клеток через связывание апоптотического рецептора Fas (CD95, Apo-1) на их поверхности [49]. Напротив, цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD8⁺ в основном лизируют клетки-мишени, выделяя такие цитотоксические молекулы, как перфорин и гранзим.

Заражение моноцитов здоровых доноров низкой дозой живых *M. tuberculosis* H37Rv приводит к их спонтанному апоптозу *in vitro* [25], который происходит в результате взаимодействия Fas и Fas-лиганда (FasL) [31].

Апоптоз моноцитов может быть вызван действием на них фактора некроза опухолей α (TNF α), тогда как провоспалительные цитокины, например интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и моноцитов), предотвращает спонтанный апоптоз [14]. Апоптоз макрофагов, индуцируемый *M. tuberculosis* H37Ra, зависит от синтеза TNF α [23]. Хемокиновый фактор 4 тромбоцитов защищает моноциты от апоптоза и вызывает дифференцировку моноцитов в макрофаги [14]. Таким образом, выживание моноцитов, их дифференцировка и функциональная активность в сайте воспаления регулируются целой сетью цитокиновых взаимодействий.

Важно понять, полезен или вреден для хозяина апоптоз макрофагов, содержащих микобактерий. С одной стороны, организм теряет клетки, способные уничтожить инфекционный агент, с другой — микобактерий теряют свое привычное место обитания [59]. Заражение альвеолярных макрофагов (АМФ) *M. tuberculosis* H37Rv и H37Ra *in vitro* вызывает значительное уменьшение жизнеспособности этих клеток из-за апоптотических процессов [12, 43, 45, 46], причем заражение вирулентными микобактериями (*M. tuberculosis* H37Rv, Erdman, клинический изолят *M. tuberculosis* BMC 96.1 и *M. bovis* дикого типа) вызывает апоптоз в значительно меньшей степени, чем заражение авирулентными или аттенуированными штаммами (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG и *M. kansasii*) [44, 65]. Интересно, что повышенный уровень апоптоза не связан с быстрым ростом микобактерий в АМФ: бактерии вирулентных штаммов размножаются быстрее, но слабее индуцируют апоптоз [76]. Добавление экзогенного TNF α приводит к повышенному цитолизу АМФ, но биологическая активность TNF α опять-таки ниже в супернатанте АМФ, зараженных H37Rv [32]. Клинические изоляты микобактерий туберкулеза обладают еще большей способностью подавлять апоптоз зараженных макрофагов, чем лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv [40]. Напротив, заражение микобактериями альвеолярных эпителиальных клеток подавляет их апоптоз и вызывает некроз [18]. Учитывая, что апоптоз предотвращает высвобождение внутриклеточных компонентов и распространение микобактерий, изолируя патоген в апоптотических телах, представляется справедливой гипотеза, что апоптоз макрофагов является важным защитным механизмом при микобактериальной инфекции. В пользу этого положения свидетельствуют и многочисленные экспериментальные данные.

Микобактерий туберкулеза с пониженной продукцией железозависимой супероксиддисмутазы (SOD) элиминируются из легких мышей легче, чем вирулентный штамм H37Rv [26]. При этом в легких зараженных мышей SOD-аттенуированные микобактерий вызывают сильную инфильтрацию ткани интерстициальными мононуклеарами с высоким уровнем апоптоза в первые 24 ч. Напротив, вирулентный штамм H37Rv вызывает слабый ранний воспалительный ответ и почти без апоптоза мононуклеаров. Заражение микобактериями туберкулеза вызывает апоптоз и в иммортализованных макрофагальных линиях, полученных от мышей [33, 67—69]. Макрофаги резистентной линии B10R более предрасположены к апоптозу, чем макрофаги чувствительной линии BIOS. При этом и ингибция внутриклеточного размножения микобактерий, и апоптоз зависят от продукции активных форм азота, которая выше у макрофагов линии B10R. Авирулентные микобактерий слабо индуцируют синтез оксида азота (NO) и не вызывают апоптоза. Более того, убитые *M. tuberculosis* и микобактериальный липоарабиноманнан (LAM) предотвращают апоптотическую гибель макрофагов.

В нескольких работах была сделана попытка выяснить различия между вирулентными и авирулентными микобактериями в отношении индукции апоптоза на биохимическом уровне. Было установлено, что вызванный микобактериями туберкулеза апоптоз макрофагов может быть ингибирован LAM с присоединенной маннозой (ManLAM) [51, 56, 70]. Оказалось, что ManLAM модулирует Ca²⁺-зависимые внутриклеточные события при апоптозе. Заражение макрофагов микобактериями туберкулеза вызывает выброс Ca²⁺, который в свою очередь блокируется ManLAM [71]. Кроме того, ManLAM участвует в фосфорилировании и нейтрализации белка Bad — члена семейства проапоптотических белков Bcl2. Это приводит к увеличению продолжительности жизни зараженного макрофага и ингибирует продукцию ИЛ-12 макрофагами [35]. ManLAM специфически взаимодействует с Toll-подобным рецептором 2 (TLR2) [19]. Судя по всему, ManLAM — это один из факторов вирулентности микобактерий, контролирующей апоптоз макрофагов хозяина. Напротив, LAM непатогенных микобактерий (PILAM) вызывает обратный эффект, индуцируя апоптоз [13].

Как известно, *M. tuberculosis* активно ингибирует слияние фагосом и лизосом в макрофагах [53] и препятствует закислению содержимого фаголизосом [77]. Добавление АТФ к зараженным макрофагам приводит одновременно к апоптозу клеток и киллингу внутриклеточных микобактерий [29]. АТФ стимулирует фаголизосомное слияние, приводящее к гибели микобактерий, через активацию рецептора P2X [7]. Было показано, что на ранней стадии FasL-индуцированного апоптоза происходит закисление содержимого цитоплазматических органелл [34]. В результате, возможно, блок слияния фагосом с лизосомами отменяется. Таким образом, апоптоз инфицированных макрофагов может служить защитным механизмом организма-хозяина в борьбе с внутриклеточной инфекцией. Перед гибелью макрофаг может убить или ослабить микобактерий, которые после разрушения клетки захватываются свежими фагоцитами.

Недавно было показано, что апоптоз, вызванный микобактериями туберкулеза, усиливается при ингибировании гена *Bcl2* (продукт которого является ингибитором апоптоза). Авирулентные бактерии *M. tuberculosis* H37Ra или *M. bovis* BCG вызывают снижение экспрессии гена *Bcl2* в мононуклеарных фагоцитах, но изменений в экспрессии генов *Bax* и *bcl-xS*, которые индуцируют апоптоз, не происходит [45, 55]. Напротив, исследование срезов тканей легкого мышей после заражения вирулентными микобактериями показало, что экспрессия проапоптотического белка *Bcl2* в макрофагах повышена, а экспрессия проапоптотического белка *Bax* снижена. Вероятно, повышенная продукция *Bcl2* зараженными макрофагами повышает выживаемость микобактерий в клетке и служит одним из путей "уклонения" микобактерий от иммунного ответа [54]. Об этом же свидетельствует тот факт, что экспрессия белка *Mcl1*, члена семейства антиапоптотических белков *Bcl2*, увеличивается в макрофагах после заражения микобактериями туберкулеза H37Rv, но не H37Ra, а также после фагоцитоза убитых микобактерий или латексных шариков [74]. Антиапоптотический эффект *Mcl1* способствует выживанию вирулентных микобактерий в клетках.

Апоптоз зараженных *M. tuberculosis* макрофагов влияет на жизнеспособность самих микобактерий [57]. Индуцированный Fas-лигандом апоптоз резко уменьшает жизнеспособность вирулентных *M. tuberculosis* H37Rv и авирулентных H37Ra. 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 FasL-индуцированному апоптозу и уменьшается экспрессия самого Fas.

Таким образом, ответом макрофагов на микобактерий туберкулеза является запуск механизмов апоптоза — важнейшего компонента эффективной антимикобактериальной защиты. Вирулентные микобактерий уходят от этой защиты, индуцируя некроз, приводящий к их неконтролируемому размножению в некротизированной ткани. 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 [24].

Апоптоз нейтрофилов при туберкулезной инфекции. Заражение нейтрофилов человека микобактериями туберкулеза H37Rv и H37Ra вызывает их быструю гибель через апоптоз [10, 61]. Апоптоз связан с повышением продукции проапоптотического белка *Bax* и снижением продукции проапоптотического белка *Bcl-xL*. Кроме того, фагоцитоз нейтрофилов, вошедших в апоптоз, макрофагами повышает продукцию последними провоспалительного цитокина TNF α . Культивируемые *in vitro* полиморфноядерные нейтрофилы больных туберкулезом сильнее подвержены спонтанному апоптозу. Заражение нейтрофилов микобактериями усиливает их апоптоз, индуцируемый взаимодействием *M. tuberculosis* с TLR2 [11].

Недавно было показано [28], что легочные нейтрофилы сверхчувствительных к туберкулезу мышей линии I/St после заражения микобактериями живут дольше и гораздо более резистентны к Fas-опосредованному апоптозу, чем легочные нейтрофилы резистентных мышей линии A/Sn. Принимая во внимание слабую способность нейтрофилов подавлять рост микобактерий, было выявлено, что накопление нейтрофилов в очаге туберкулезного воспаления приводит к развитию патологии, когда нейтрофилы, вероятно, играют роль "тро-

янского коня" для микобактерий. Весьма сходные результаты были получены при изучении другой внутриклеточной инфекции — лейшманиоза [80].

Таким образом, апоптоз зараженных нейтрофилов может представлять собой важный защитный механизм, приводящий к избирательному удалению зараженных клеток из очага воспаления и усиливающий функциональную активность тканевых макрофагов.

Апоптоз Т-лимфоцитов при туберкулезной инфекции. Антигенная стимуляция приводит к активации и размножению Т-клеток, поэтому должен запускаться механизм, позволяющий элиминировать клоны клеток, которые больше не нужны, и поддерживать гомеостаз в иммунной системе. Одним из таких механизмов является индуцированная активацией клеточная гибель (A1CD) [7, 8, 48, 50]. Она происходит в результате повторного связывания антигена с Т-клеточным рецептором уже активированной клетки. Гибель Т-клеток происходит по апоптотическому пути. Этот путь, по некоторым данным, требует взаимодействия между Fas и FasL, причем синтез FasL увеличивается после антигенной стимуляции большими количествами антигена [9, 79]. Этот механизм, с одной стороны, помогает поддерживать клеточный гомеостаз [81], а с другой — препятствует длительному ответу Т-клеток на антигены, что может неблагоприятно влиять на течение хронических инфекционных заболеваний, таких как туберкулез [64, 78].

Больные туберкулезом часто имеют ослабленный иммунный ответ на микобактериальные антигены и сниженный уровень иммунокомпетентных клеток в результате апоптоза CD4-позитивных Т-клеток (вторичный иммунодефицит). Недавно было показано, что лимфоциты больных острым прогрессирующим туберкулезом и казеозной пневмонией сильнее подвержены апоптозу, чем лимфоциты больных с инфильтративной формой туберкулеза и здоровых доноров [4]. Было высказано предположение, что элиминация иммунокомпетентных клеток в результате апоптоза приводит к развитию иммунодефицитных состояний у таких больных. На это указывает и тот факт, что CD4- и CD8-положительные Т-клетки больных туберкулезом легких экспрессируют больше апоптозного маркера Fas по сравнению со здоровыми туберкулинположительными донорами [37]. Мононуклеары периферической крови таких пациентов сильнее подвержены спонтанному апоптозу и апоптозу в ответ на микобактериальные антигены *in vitro*. Кроме того, при заражении микобактериями туберкулеза контрольных мышей и мышей с "нокаут-мутацией" Fas-лиганда оказалось, что, несмотря на потерю иммунного ответа и апоптоз Т-клеток, разницы по тяжести инфекции между группами не наблюдалось. Это может свидетельствовать о слабом влиянии Fas-опосредованного механизма апоптоза на течение туберкулезной инфекции [60].

При исследовании экспрессии Fas на лимфоцитах периферической крови здоровых доноров и больных легочным туберкулезом оказалось, что повышенное содержание Fas⁺ Т-лимфоцитов характерно для больных с неблагоприятной клинической картиной [73]. Т-лимфоциты периферической крови больных легочным туберкулезом характеризуются повышенным апоптозом по сравнению с клетками здоровых доноров. В то же время сыворотка крови этих больных обладает антиапоптотической активностью, что может быть одним из компенсаторных механизмов [58]. Лимфоциты таких больных более чувствительны к апоптогенному действию дексаметазона [1]. Интересно, что уровень апоптоза Т-лимфоцитов коррелирует с обструктивными нарушениями вентиляции легких [6] и со снижением пролиферативного ответа на ППД [5]. Следует отметить, что, помимо апоптоза, снижение антигенспецифического ответа у больных туберкулезом может быть обусловлено анергией Т-клеток.

Спонтанный апоптоз CD4⁺- и CD4⁻ Т-лимфоцитов в плевральной жидкости больных туберкулезным плевритом коррелирует с потерей ИФН- γ -продуцирующих Т-клеток, специфичных к *M. tuberculosis* [39]. Интересно, что и уровень ИФН- γ [41], и концентрация молекул, участвующих в апоптотических реакциях, таких как Fas, Fas-лиганд и TNF α [21], выше в плевральной жидкости, чем в плазме крови. Кроме того, были получены данные о повышенной концентрации Fas-лиганда в плевральной жидкости в экссудате у больных туберкулезным плевритом по сравнению с таковой у больных с аденокарциномой легких, что может служить диагностическим признаком для дифференцирования этих распространенных заболеваний [82]. Продолжительный кон-

такт специфических Т-клеток с микобактериями в сайтах инфекции может запускать порочный круг: иммунная активация и потеря отвечающих на антиген Т-клеток происходят параллельно, что приводит к персистированию туберкулезной инфекции.

Динамика воспаления при туберкулезе может выражаться как в регрессии, так и в росте гранулем, а также может привести к образованию казеоза. По результатам биопсий апоптотические Т-клетки не обнаруживаются в регрессирующих гранулемах [30]. В продуктивных гранулемах, без казеозного некроза, обнаруживаются лишь единичные апоптотические клетки, тогда как огромное количество апоптотических CD68-положительных макрофагов и CD45RO-положительных Т-клеток присутствует в областях образования казеоза. Макрофаги, окружающие участок казеоза, практически не синтезируют противоапоптотический белок Bcl2, зато синтезируют проапоптотический белок Bax. Большая часть Т-лимфоцитов, находящихся в этой зоне, активированы и вырабатывают как провоспалительный цитокин ИФН- γ , так и фактор— апоптоза FasL. Все это указывает на то, что формирование казеоза непосредственно связано с индуцированной активацией гибелью Т-клеток.

В процессе образования казеозного некроза большое количество Fas- и FasL-положительных лимфоцитов входят в апоптоз. Считается, что это происходит в результате индуцированной активацией клеточной гибели при постоянном взаимодействии Т-клеток с микобактериальными антигенами. Было показано, что повторная стимуляция микобактериальными антигенами выращенных *in vitro* специфичных к ППД Т-хелперов типа 1 (Th1) приводит к снижению ответа и гибели в результате апоптоза CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов [75]. Апоптоз этих лимфоцитов происходит по Fas/FasL-зависимому пути. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что в казеозных туберкулезных гранулемах Т-лимфоциты погибают в результате индуцированной активацией клеточной гибели.

Известно, что иммунный ответ Т-хелперов типа 1 резко снижается при развитии прогрессирующей туберкулезной инфекции. Было показано, что индуцированный микобактериальными антигенами и спонтанный апоптоз CD4⁺- Т-клеток значительно быстрее происходит у больных туберкулезом по сравнению со здоровыми донорами, хотя культивирование клеток с контрольным антигеном (*Candida albicans*) не вызывает апоптоза в обеих группах [38]. Установлено, что инфекция *M. tuberculosis* повышает экспрессию Fas и уменьшает экспрессию Bcl2 (ингибитор апоптоза) в CD4⁺- Т-клетках [20]. Высокая экспрессия Fas обычно проявляется у активированных CD4⁺- Т-клеток с фенотипом CD44^{hi}/CD45RB^{hi} [66]. При стимуляции *in vitro* возрастает доля активированных клеток, входящих в апоптоз, и снижается продукция ИЛ-2 и ИФН- γ . Селективный апоптоз Th1 может приводить к потере клеточного ответа на микобактерии туберкулеза. ИФН- γ , являясь одним из необходимых компонентов защиты против микобактерии, также может модулировать локальный клеточный ответ, подавляя активацию лимфоцитов и направляя их в апоптоз, что может ограничивать чрезмерное воспаление [16].

Недавно на модели конгенных по H2 линий мышей было показано, что Т-клетки резистентных к туберкулезу мышей отвечают пролиферацией на повторяющиеся стимуляции микобактериальными антигенами, тогда как Т-клетки чувствительных к туберкулезу мышей погибают уже после второй стимуляции [63]. Различия между двумя группами линий мышей по способности сохранять ответ на микобактериальные антигены коррелировали с повышением экспрессии Fas и антигениндуцированным апоптозом у чувствительных к туберкулезу мышей [3, 62]. Таким образом, элиминация Т-клеток по механизму индуцированной активацией клеточной гибели может препятствовать специфическому длительному ответу и неблагоприятно влиять на течение такой хронической инфекции, как туберкулез [2].

Заключение

Следует отметить, что парадокс иммунного ответа на микобактерии туберкулеза заключается в одновременной активации и анергии иммунокомпетентных клеток. Изучение апоптоза как одного из механизмов супрессии Т-клеточного иммунного ответа при туберкулезе может помочь решить, в какой мере гибель разных популяций клеток служит протективным или патологическим механизмом в организме хозяина.

В связи с приведенными выше данными апоптоз макрофагов, основных клеток врожденного иммунитета, является важнейшим защитным механизмом при микобактериальной инфекции, уменьшая жизнеспособность бактерий, изолируя их и предотвращая их распространение. В свою очередь в процессе эволюции вирулентные микобактерии, в том числе и клинические изоляты, развили способность подавлять апоптоз макрофагов. Напротив, апоптоз Т-лимфоцитов, вызванный постоянной стимуляцией микобактериальными антигенами, является неблагоприятным фактором при туберкулезной инфекции. Потеря равновесия между пролиферацией Т-клеток и индуцированной активацией клеточной гибелью приводит к элиминации потенциально защищающих специфических клонов, завершающейся персистенцией инфекции и развитием вторичных иммунодефицитных состояний. Все это подчеркивает важность изучения механизмов, участвующих в протективном ответе и в патологии, для создания новых вакцин и разработки лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойчук С. В., Якушев М. Ф., Мустафин И. Г. и др // Пробл. туб. - 2003. — № 6. — С. 36-39.
2. Ерохин В. В., Земскова З. С. // Пробл. туб. — 2003. - № 3.- С. 11-21.
3. Личугин А. В. Свойства Т-клеток конгенных по Н-2 инбредных мышей при ответе на микобактериальные антигены: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2000.
4. Хоменко А. Г., Ковальчук Л. В., Мишин В. И. и др. // Проб, туб. - 1996. - № 6. - С. 6-10.
5. Черных Е. Р., Сахно Л. В., Хонина М. А. и др. // Пробл. туб.- 2002. — № 7. — С. 43-48.
6. Якушев М. Ф., Бойчук С. В., Визель А. А. и др. // Пробл. туб. - 2004. — № 5. — С. 10-13.
7. Abbas A. K. // Cell. - 1996. - Vol. 84. - P. 655-657.
8. Agostini C, Perin A., Semenzato G. // Curr. Opin. Pulm. Med.- 1998. - Vol. 4. - P. 261-266. и др.