

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ ВЛИЯТЬ НА АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ТУБЕРКУЛЁЗУ МЫШЕЙ

В. В. ЕРЕМЕЕВ, В. Я. ГЕРГЕРТ

INVESTIGATION OF THE ABILITY OF GLUTOXIM TO AFFECT THE ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF PHAGOCYTES IN TUBERCULOSIS-SUSCEPTIBLE AND RESISTANT MICE

V. V. EREMEEV, V. YA. GERGERT

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Исследована способность препарата глутоксим (бис-(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин динатриевая соль) *in vitro* модулировать цитостатический эффект макрофагов и нейтрофилов чувствительных и устойчивых к туберкулёзу мышей в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. Показано, что, не обладая прямым бактерицидным или бактериостатическим действием на микобактерии, глутоксим способен потенцировать антибактериальную активность макрофагов. При этом эффект препарата зависит от генотипа тестируемых клеток (более выражен в системе с макрофагами мышей линии I/St по сравнению с макрофагами мышей C57/BL6) и, по-видимому, связан с положительным влиянием глутоксима на выживание заражённых макрофагов, восстановлением их способности к уничтожению *Mycobacterium tuberculosis*.

Ключевые слова: : туберкулёз, микобактерия, макрофаг, Глутоксим.

The authors investigated *in vitro* the ability of glutoxim (bis-(gamma-L-glutamyl)-L-cysteinyl-bis-glycine disodium salt) to simulate the cytostatic effect of macrophages and neutrophils in mice susceptible and resistant to *Mycobacterium tuberculosis*. Having no direct bactericidal or bacteriostatic effect on mycobacteria, glutoxim was shown to be able to potentiate the antibacterial activity of macrophages. Moreover, the effect of the agent depended on the genotypes of test cells (more pronounced in the system of macrophages of I/St mice than in those of C57/BL6 mice) and seemed to be associated with the positive effect of glutoxim on the survival of inoculated macrophages, recovery of their capacity to destroy *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: tuberculosis, mycobacteria, macrophage, Glutoxim.

Внутриклеточное персистирование патогенных бактерий – одна из самых сложных форм инфекционного процесса, и это в полной мере относится к такой инфекции, как туберкулёз. Тот факт, что клиническая форма заболевания развивается лишь у небольшого процента инфицированных людей [7], как и сама длительность инфекционного процесса, принимающего зачастую хронический характер, указывает на сложный, многокомпонентный характер взаимодействия между *M. tuberculosis* и организмом-хозяином. В соответствии с этим множество генов микобактерий, контролирующих, в частности, факторы вирулентности, биосинтез клеточной стенки и липидный метаболизм, обеспечивает их выживание в макрофагах хозяина [2]. Генетический контроль чувствительности и лекарственной устойчивости к микобактериальным инфекциям у человека и животных также носит полигенный характер [1, 3] и затрагивает различные механизмы естественной устойчивости и адаптивного иммунного ответа. В этой связи, анализируя связь между генетическими различиями по восприимчивости к инфекции с различиями по эффективности антимикобактериальной защиты на клеточном и субклеточном уровнях, необходимо очень чётко определить ус-

ловия, в которых можно зарегистрировать физиологическую значимость того или иного механизма протекции.

Апоптоз заражённых *M. tuberculosis* макрофагов влияет на жизнеспособность самих микобактерий [10, 11]. Индуцированный Fas-лигандом апоптоз резко уменьшает жизнеспособность вирулентных *M. tuberculosis* H37Rv и авирулентных H37Ra. В то же время гибель заражённых макрофагов в результате некроза не оказывает существенного влияния на жизнеспособность микобактерий. Более того, у заражённых макрофагов усиливается устойчивость к FasL-индуцированному апоптозу и уменьшается экспрессия самого Fas.

Таким образом, ответом макрофагов на микобактерии туберкулёза является запуск механизмов апоптоза – важнейшего компонента эффективной антимикобактериальной защиты. Вирулентные микобактерии уходят от этой защиты, индуцируя некроз, приводящий к их неконтролируемому размножению в некротизированной ткани. У заражённых макрофагов целостность митохондриальной мембраны, низкая активность каспаз и пониженный выброс митохондриального цитохрома C сопряжены с апоптозом и эффективной антимикобактериальной защитой. Напротив, повреж-

дение митохондриальной мембраны и активация каспаз происходят при некрозе и способствуют размножению микобактерий [8].

Заражение нейтрофилов человека микобактериями туберкулёза H37Rv и H37Ra вызывает их быструю гибель через апоптоз [5, 6]. Апоптоз связан с повышением продукции проапоптозного белка Вах и снижением продукции противовоспалительного белка Bcl-xL. Кроме того, фагоцитоз нейтрофилов, вошедших в апоптоз, макрофагами повышает продукцию последними провоспалительного цитокина TNF- α . Культивируемые *in vitro* полиморфно-ядерные нейтрофилы больных туберкулёзом сильнее подвержены спонтанному апоптозу. Заражение нейтрофилов микобактериями усиливает их апоптоз, индуцируемый взаимодействием *M. tuberculosis* с TLR2.

В нашей лаборатории было показано [5], что нейтрофилы сверхчувствительных к туберкулёзу мышей линии I/St после заражения микобактериями живут дольше и гораздо более устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу, чем нейтрофилы резистентных мышей линии A/Sn или C57BL/6. Принимая во внимание слабую способность нейтрофилов подавлять рост микобактерий, выявлено, что накопление нейтрофилов в очаге туберкулёзного воспаления приводит к развитию патологии, когда нейтрофилы, вероятно, играют роль «троянского коня» для микобактерий.

Таким образом, апоптоз заражённых нейтрофилов может представлять собой важный защитный механизм, приводящий к избирательному удалению заражённых клеток из очага воспаления и усиливающий функциональную активность тканевых макрофагов. Кроме того, клинические наблюдения A. R. Martineau et al. (2007) позволили им утверждать, что существенная роль нейтрофилов во врождённой устойчивости к туберкулёзной инфекции связана с их способностью продуцировать как полноразмерные структуры катионных антимикробных пептидов, так и их отдельные полипептидные фрагменты – регуляторы внутренних защитных систем организма (innate defense regulators, IDR) [9]. Показано, что IDR способны модулировать цитостатический эффект макрофагов и нейтрофилов в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. IDR рассматриваются в фармакологических решениях как препараты иммуномодулирующего действия, агенты прямого или непрямого (за счёт опосредования защитных реакций против патогенов *in vivo*) антибактериального действия. Опосредованное противомикробное действие может базироваться на модулировании специфических внутриклеточных путей передачи сигналов, усиленной продукции хемокинов, модулировании эффектов провоспалительных цитокинов (ФНО- α и др.).

Первым и единственным разрешённым к клиническому применению в России препаратом, от-

несённым к группе регуляторов внутренних защитных систем организма, является Глутоксим® [4].

В связи с вышеизложенным возникла необходимость изучить способность препарата глутоксим модулировать цитостатический эффект макрофагов и нейтрофилов чувствительных и устойчивых к туберкулёзу мышей в отношении *Mycobacterium tuberculosis*.

Материалы и методы

Мышей инбредных линий I/StSnEgYCit (I/St) и C57BL/6 (B6) содержали в виварии ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН в нестерильных условиях в соответствии с Указом Минздрава № 755 и рекомендациями Управления по обеспечению благополучия лабораторных животных А5502-01. В экспериментах использовали самок в возрасте от 2 до 4 мес. Для каждого эксперимента пулировали клетки от 3-4 сингенных мышей.

Макрофаги костно-мозгового происхождения (КММф) получали из костного мозга (КМ), выделенного из бедренной и большой берцовой костей мышей линий I/St и B6. После центрифугирования при 500 г эритроциты лизировали добавлением к клеточному осадку лизирующего буфера (9 : 1 смесь 0,16 М NH₄Cl и 0,17 М Tris base, pH 7,2) при температуре 37°C в течение 5 мин. После троекратной отмывки (среда DMEM + 2% телячьей сыворотки) клетки ресуспендировали в среде D.10 (DMEM + 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) + 2 мМ L-глутамин + 5 мМ HEPES), содержащей 15% кондиционированной среды, полученной в результате культивирования клеточной линии мышинных фибробластов L929 (LCM), в качестве источника фактора, стимулирующего формирование макрофагальных колоний (M-CSF). Полученные таким образом клетки инкубировали в 100-мм чашках Петри в количестве 5 × 10⁶/10 мл в CO₂-инкубаторе при 7% CO₂ и 37°C. Через 3 сут культивирования в каждую чашку добавляли по 5 мл D.10+15% LCM. Ещё через 3 сут, когда клеточный монослой достигал 90%, для успокоения клеток среду заменяли (D.10 без LCM) и инкубировали ещё 24 ч. Клетки снимали с пластика раствором Версена [2 мМ ЭДТА на фосфатно-солевом буфере (PBS)] при 37°C с последующим интенсивным пипетированием. КММф троекратно отмывали в отмывочной среде, ресуспендировали в среде D.2 (DMEM + 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS) + 2 мМ L-глутамин + 5 мМ HEPES) и подсчитывали их количество для дальнейшего использования.

Нейтрофилы костно-мозгового происхождения (КМНф) выделяли из КМ мышей линий I/St и B6 с помощью метода позитивной магнитной сепарации на колонках с использованием набора Anti-Ly-6G MicroBead Kit (mouse) фирмы Miltenyi Biotec по методике, рекомендованной фирмой.

Перитонеальные нейтрофилы (ПНф) получали по протоколу, предложенному Metcalf et al. (2011). Мышам I/St и В6 внутрибрюшинно вводили 2 мл 0,2% (масса/объём) стерильного раствора казеина в PBS. Через 3 ч после инъекции брюшную полость убитых мышей промывали стерильным PBS, собранные клетки отмывали центрифугированием, переводили в среду D.2 и подсчитывали для дальнейшего использования. Полученные клеточные суспензии состояли преимущественно из ПНф (примесь макрофагов в суспензиях не превышала 5%). Время инкубирования ПНф с микобактериями было сокращено (48 вместо 72 ч) из-за ускоренной гибели ПНф в культуре (по сравнению с КМНф).

Для получения *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) (МТБ) в фазе логарифмического роста аликвоту микобактерий из глубокой заморозки высевали в 5 мл среды Дюбо (Difco, Detroit, Mich.) с 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,5% олеиновой кислоты и инкубировали 1 нед. при 37°C. Затем суспензию микобактерий разводили в той же среде (0,5 мл в 20 мл) и инкубировали еще 1 нед. при 37°C. Полученную суспензию трижды отмывали раствором Версена (3 000 г, 4°C), ресуспендировали в среде D.2 и фильтровали через фильтр с диаметром пор 5 мкм (Sigma) для удаления комков. Для подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) пятикратные серийные разведения фильтратов высевали на агар Дюбо и подсчитывали под инвертированным микроскопом (Olympus, Osaka, Japan) через 3 сут культивирования при 37°C. Хранение фильтрованной культуры при 4°C в течение 3 сут не приводило к снижению числа КОЕ.

Выход лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток как меру клеточного лизиса определяли по уровню ферментативной активности ЛДГ в супернатантах культур клеток с помощью набора CytoTox 96 kit (Promega, Madison, Wis.) по методике, рекомендованной производителем. Процент специфического лизиса оценивали по следующей формуле: $(A_{490} \text{ в экспериментальных лунках} - A_{490} \text{ после спонтанного выхода}) / (490 \text{ после полного лизиса} - A_{490} \text{ после спонтанного выхода}) \times 100$.

Антимикобактериальную активность клеток оценивали по поглощению $[^3\text{H}]$ урацила, как описано ранее (Majorov et al., 2003).

Схема эксперимента. В лунку 96-луночного планшета добавляли 4×10^3 КММф, давали клеткам прилипнуть в течение 1 ч, затем – глутоксим в концентрациях, указанных на рисунках, 4×10^3 КМНф и 8×10^4 МТБ. Культуры инкубировали 72 ч при 7% CO_2 и 37°C, последние 18 ч в присутствии $[^3\text{H}]$ урацила. Аликвоты для определения ЛДГ забирали непосредственно перед окончанием культивирования. Нейтрофилы добавляли в тех же концентрациях, что и макрофаги (4×10^3).

Изучены следующие комбинации:

1. *M. tuberculosis* per se
2. *M. tuberculosis* + глутоксим
3. *M. tuberculosis* + макрофаги
4. *M. tuberculosis* + макрофаги + глутоксим
5. *M. tuberculosis* + нейтрофилы
6. *M. tuberculosis* + нейтрофилы + глутоксим
7. *M. tuberculosis* + макрофаги + нейтрофилы
8. *M. tuberculosis* + макрофаги + нейтрофилы + глутоксим

Результаты и обсуждение

В предварительной серии экспериментов было исследовано влияние различных концентраций глутоксима на жизнеспособность КММф и ПНф в культуре. Как видно из представленных на рис. 1 данных, показатель гибели макрофагов I/St не превышал 2% и не зависел от концентрации препарата в среде. Аналогичные результаты получены при изучении жизнеспособности ПНф I/St, а также клеток В6 в зависимости от присутствия различных концентраций глутоксима в среде (данные не приведены).

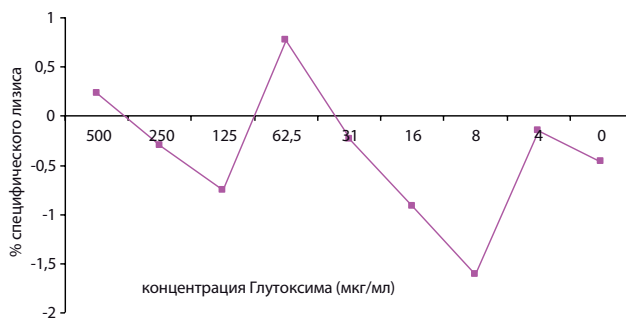


Рис. 1. Влияние глутоксима на жизнеспособность неинфицированных макрофагов. Культуры клеток инкубировали так, как указано в примечании к рис. 2. Процент специфического лизиса (выход ЛДГ) оценивали по формуле: $(A_{490} \text{ в экспериментальных лунках} - A_{490} \text{ после спонтанного выхода}) / (490 \text{ после полного лизиса} - A_{490} \text{ после спонтанного выхода}) \times 100$

Таким образом, установлено, что в отсутствие инфекции глутоксим не оказывает токсического воздействия на культивируемые клетки.

В следующей серии экспериментов было изучено действие глутоксима на МТБ. Полученные результаты указывают на отсутствие прямого влияния глутоксима на пролиферацию МТБ в бесклеточной культуре (график Rv only на рис. 2). КММф чувствительной линии мышей приблизительно в 2 раза подавляют рост МТБ *in vitro* (точка 0 на графике для I/St, рис. 2).

Добавление в систему глутоксима дозозависимо усиливает антимикобактериальный эффект макрофагов, причём потенцирующее действие лекарственного средства более выражено в отношении КММф мышей чувствительной к туберкулёзу

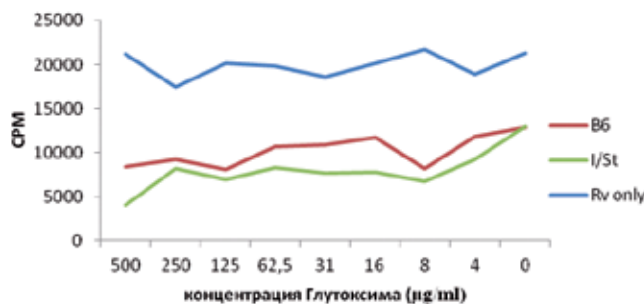


Рис. 2. Влияние глутоксима на выживание МТБ в КММф. Культуры клеток инкубировали 72 ч при 7% CO₂ и 37°C, последние 18 ч в присутствии ³H]урацила. Уровень включения ³H]урацила измеряли на сцинтилляционном счётчике

линии I/St (рис. 2). Так, если в отсутствие препарата включение метки составляет примерно 13 000 СРМ у макрофагов обеих линий (точка 0 на рис. 2), то у КММф В6 включение метки не превышает 10 000 СРМ, начиная с концентрации глутоксима 125 мкг/мл и выше, а у КММф I/St соответствующий показатель снижается до 6 000-8 000 СРМ при концентрации глутоксима уже свыше 8 мкг/мл.

Определение корреляции наблюдаемых изменений метаболической активности микобактерий с дозой препарата по методу Пирсона дало следующие результаты: для КММф I/St $r = -0,64$, $p = 0,0313$ (высокодостоверно), а для КММф В6 $r = -0,58$, $p = 0,0525$ (тенденция). Таким образом, несмотря на то что по формальным признакам эффект глутоксима в КММф В6 нельзя считать достоверным, высокосignificantный результат действия препарата в макрофагах мышей чувствительной линии позволяет сделать вывод об эффективности применения глутоксима в данной схеме. Пограничное значение p (0,0525) для В6 предполагает, что повторное тестирование (увеличение числа повторов) позволит достичь математической достоверности и для макрофагов В6.

Поскольку прямое влияние глутоксима на пролиферацию МТБ отсутствует, то возможно предположить, что антибактериальный эффект глутоксима в культуре КММф связан с его способностью препятствовать гибели заражённых МТБ КММф в культуре. Более высокая выживаемость макрофагов в этих условиях обеспечивает более выраженную их активность в отношении МТБ. Об этом свидетельствует пониженный выход ЛДГ из клеток в присутствии глутоксима (рис. 3).

Определённые сложности, связанные с высоким уровнем включения радиоактивной метки в нейтрофилы костно-мозгового происхождения (КМНф), возникли при изучении влияния глутоксима на антимикобактериальную функцию нейтрофилов. Такой высокий фон при включении ³H]урацила (7 000-10 000 СРМ в сравнении с 2 000-3 000 СРМ при использовании КМНф) объясняется, по-видимому, высокой метаболической

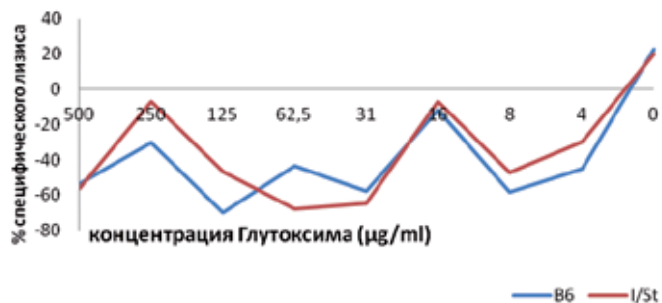


Рис. 3. Влияние глутоксима на жизнеспособность инфицированных макрофагов. Культуры клеток инкубировали так, как указано в примечании к рис. 1. Процент специфического лизиса (выход ЛДГ) оценивали по формуле: (A490 в экспериментальных лунках – A490 после спонтанного выхода)/(A490 после полного лизиса – A490 после спонтанного выхода) × 100

активностью КМНф и в значительной степени маскирует влияние глутоксима на микобактерии. В связи с этим в дальнейших экспериментах были использованы казеин-индуцированные перитонеальные нейтрофилы (ПНф), полученные по протоколу, предложенному Metcalf et al. (2011).

Приведённые на рис. 4 результаты показывают, что глутоксим не влияет на способность ПНф модифицировать метаболизм МБТ. Уровень включения метки микобактериями в среде D.2 в отсутствие ПНф в данном эксперименте составлял $3\,278 \pm 190$ СРМ.

Таким образом, культивируемые в условиях *in vitro* ПНф сами по себе не способны подавлять метаболическую активность МБТ, и добавление в систему глутоксима эту ситуацию изменить не возможно.

В отличие от этого комбинация КММф и ПНф существенно подавляет включение метки микобактериями (рис. 5) по сравнению с контролем МБТ без клеток (Rv only $3\,278 \pm 190$ СРМ).

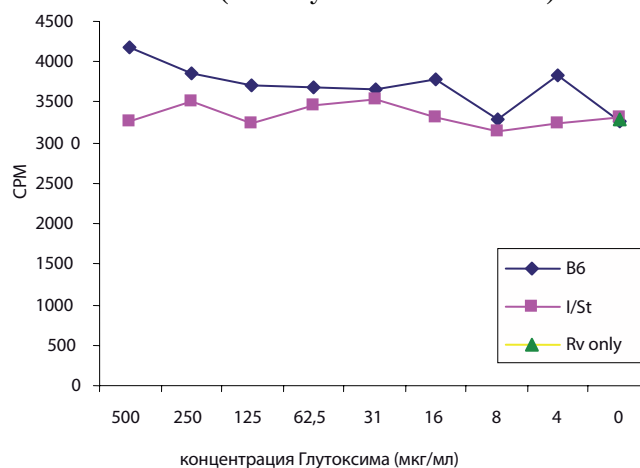


Рис. 4. Влияние глутоксима на выживание МТБ в ПНф. Культуры клеток инкубировали 48 ч при 7% CO₂ и 37°C, последние 18 ч в присутствии ³H]урацила. Уровень включения ³H]урацила измеряли на сцинтилляционном счётчике

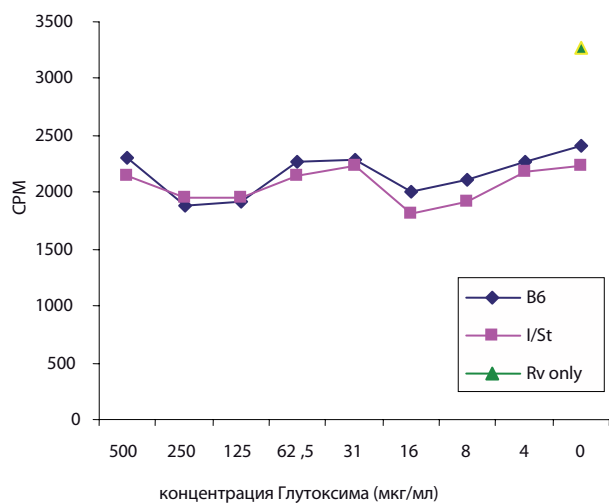


Рис. 5. Влияние глутоксима на способность комбинации КММф+ПНф подавлять метаболизм МТБ *in vitro*. Культуры клеток инкубировали 48 ч при 7% CO₂ и 37°С, последние 18 ч в присутствии ³H]урацила. Уровень включения ³H]урацила измеряли на сцинтилляционном счётчике

Однако в данной системе нам не удалось выявить достоверного дозозависимого влияния глутоксима на антимикобактериальную активность клеток.

Выводы

1. Глутоксим не оказывает токсического воздействия на мышинные клетки в культуре *in vitro*.

2. Добавление глутоксима в культуру заражённых микобактериями макрофагов способно потенцировать антибактериальную активность КММф в отношении МТБ в культуре *in vitro*.

3. Эффект глутоксима связан с положительным влиянием на выживание заражённых макрофагов в культуре *in vitro*.

4. Комбинация КММф и ПНф существенно подавляет включение метки микобактериями по сравнению с контролем МБТ без клеток. Дозозависимого влияния глутоксима на антимикобактериальную активность в данной комбинации не установлено.

5. Сравнительные исследования с макрофагами и нейтрофилами, полученными от чувствительных и устойчивых к туберкулёзу линий мышей, показали, что эффект глутоксима в предложенной схеме эксперимента зависит от генотипа тестируемых клеток и более выражен в системе с макрофагами I/St (чувствительной к туберкулёзу линии) по сравнению с макрофагами B6 (лекарственно-устойчивой).

1. Apt A. S., Kondrat'eva T. K. Tuberculosis: pathogenesis, immune responses and genetics of the host // *Mol. Biol. (Mosk)*. – 2008. – Vol. 42, № 5. – P. 880-90. Review. Russian.

2. Cole S. T., Brosch R., Parkhill J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. – 1998. – Vol. 393, № 6685. – P. 537-44. Erratum in: *Nature*. – 1998. – Vol. 396, № 6707. – P. 190.

3. di Pietrantonio T., Correa J. A., Orlova M. et al. Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection // *Infect. Immun.* – 2011. – Vol. 79, № 6. – P. 2372-2378.

4. Easton D. M., Nijnik A., Mayer M. L. et al. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives // *Trends in Biotechnology*. – 2009. – Vol. 27, № 10. – P. 582-590.

5. Eruslanov E. B., Lyadova I. V., Kondratieva T. K. et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, № 3. – P. 1744-1753.

6. González-Cortés C., Reyes-Ruvalcaba D., Diez-Tascón C. et al. Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with *Mycobacterium* spp. // *Immunol. Lett.* – 2009. – Vol. 126, № 1-2. – P. 16-21.

7. Kaufmann S. H. Rational design of novel antibacterial vaccines with an emphasis on tuberculosis // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 40, № 8. – P. 595-600. Review.

8. Keane J., Remold H. G., Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 2016-2020.

9. Martineau A. R., Newton S. M., Wilkinson K. A. et al. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 7. – P. 1988-1994.

10. Molloy A., Laochumroonvorapong P., Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Gue'rin // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 180. – P. 1499-1509.

11. Oddo M., Renno T., Attinger A. et al. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Immunol.* 1998. – Vol. 160. – P. 5448-5454.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Гергерт Владислав Яковлевич

ФБГУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением иммунологии.

107564, Москва, Яузская аллея, 2.

E-mail: hergertv@mail.ru

Поступила 7.05.2013