

4. Effect of ultrasound on activation of serine proteases precursors / S.L. Ovsianko [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2005. – Vol.12. – P. 219-223.
5. Ultrasound-assisted fibrinogen and fibrin proteolysis/ E.A. Cherniavsky [et al.] // *Advances in Medicine and Biology*, Vol.40, Chapter XII / Editor L.V. Berhardt. – Nova Science Publishers, 2013. –P. 281-296.
6. Effects of low frequency ultrasound on some properties of fibrinogen and its plasminolysis / E.A. Cherniavsky [et al.] // *BMC Biochemistry*. – 2011. – Vol.12:60.
7. Чернявский, Е.А. Экстрационное действие ультразвука при разрушении плазменного сгустка / Е.А. Чернявский, И.Э. Адзерихо, В.М. Шкуматов // *Биомедицинская химия* – 2009. – Т.55, №3. – С. 298-309.

ДВА ПУТИ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ CD4⁺ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

**Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Логунова Н.Н., Евстифеев В.В.,
Апт А.С.**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва,
Российская Федерация*

Протекция при туберкулезе (ТБ) в значительной степени определяется способностью активированных легочных макрофагов хозяина подавлять рост микобактерий. Активация макрофагов происходит за счет цитокинов и других медиаторов воспаления, в основном IFN- γ и TNF- α , секретируемых Т-лимфоцитами CD4⁺ TH-1. Эти цитокины индуцируют синтез NO $\cdot$ в макрофагах за счет активации индуцируемой формы NO-синтазы (iNOS). На модели экспериментального ТБ показано, что NO $\cdot$ и активные радикалы азота (RNI) ответственны за бактерицидные свойства макрофагов мыши. Ранее было показано, что существуют две разные субпопуляции эффекторных лимфоцитов CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi}, одна из которых имеет поверхностный фенотип CD27^{hi}, а другая CD27^{lo}. Как показано в нашей лаборатории на модели экспериментального ТБ, эти типы клеток различаются по жизнеспособности и по способности продуцировать воспалительные цитокины IFN- γ и TNF- α .

Исследования проводили на мышах линий C57BL/6 (B6), C57BL/6-TNF- $\alpha^{-/-}$ (B6-TNF- α -KO) и конгенной рекомбинантной линии 9.3.19.8 (MHC: H2A^j H2E⁰), у которой на генетическую основу мышей C57BL/6 (MHC: H2A^b H2E⁰), резистентных к ТБ, были перенесены участки области H2 от генетически восприимчивых к ТБ мышей линии I/St (MHC: H2A^j H2E^j). Макрофаги перитонеального экссудата или легочные макрофаги культивировали *in vitro* в присутствии *M.tuberculosis* штамма H37Rv и Т-лимфоцитов CD27^{hi} и CD27^{lo}. Через 72 часа после культивирования в культурах оценивали продукцию NO $\cdot$ и рост микобактерий, по включению последними ³[H]-урацила.

Было показано, что высокодифференцированные Т-лимфоциты CD27^{lo}, в отличие от своих предшественников CD27^{hi}, намного эффективнее активируют как перитонеальные, так и «наивные» легочные макрофаги, а также сильнее стимулируют образование RNI. Активирующее действие эффекторов CD27^{lo} наблюдается даже при соотношении макрофаг: Т-клетка = 625: 1, при котором RNI уже не обнаруживаются. Это дало возможность предположить наличие второго независимого от NO $\cdot$ механизма активации. Сравнение уровня экспрессии гена *tnf- α* в инфицированных макрофагах, активированных Т-лимфоцитами CD27^{hi} и CD27^{lo} показало, что CD27^{lo} значительно сильнее увеличивают уровень транскрипции данного цитокина. Для проверки вклада TNF- α в активацию инфицированных макрофагов мы использовали мышей с нокаут-мутацией в гене, кодирующем TNF- α (B6-TNF- α -KO). В системе без TNF- α Т-клетки CD27^{hi} были способны активировать макрофаги, а также стимулировать продукцию NO $\cdot$ последними только при соотношении Т-клетка : макрофаг = 1:5, в то время как Т-лимфоциты CD27^{lo} не стимулировали образование RNI, однако, активировали бактериостатическую функцию макрофагов при соотношении Т-клетка:макрофаг от 1:5 до 1:125. Для подтверждения существования NO-независимого механизма активации бактериостатической функции макрофагов Т-лимфоцитами CD27^{lo} мы использовали селективный ингибитор iNOS – (N6-(1-иминоэтил)-L-лизин, L-NIL). Добавление L-NIL в культуру макрофагов (из мышей B6) с микобактериями аннулировало активирующее действие рекомбинантного IFN- γ на бактериостатическую функцию макрофагов и продукцию последними NO $\cdot$. Наличие в культурах клеток L-NIL характеризовалось сильным снижением RNI как при CD27^{hi}, так и при CD27^{lo}, однако, Т-лимфоциты CD27^{lo} активировали антимикобактериальную активность макрофагов при соотношении Т-клетка:макрофаг от 1:25 до 1:125, что подтвердило наличие NO-независимого механизма активации бактериостатической функции макрофагов высокодифференцированными эффекторами CD27.

Классическая молекула МНС класса II определяет презентацию антигенов при развитии адаптивного иммунного ответа. В следующей серии экспериментов мы использовали конгенную рекомбинантную линию мышей 9.3.19.8 (МНС: H2A^j H2E⁰), у которых на генетическую основу мышей C57BL/6 (МНС: H2A^b H2E⁰), резистентных к ТБ, были перенесены участки области H2 от генетически восприимчивых к ТБ мышей линии I/St (МНС: H2A^j H2E^j). Макрофаги перитонеального экссудата мышей линии 9.3.19.8 культивировали совместно с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* и Т-лимфоцитами CD27^{hi} и CD27^{lo} (мышей C57BL/6). IFN- γ оказывал сильное стимулирующее действие на продукцию RNI макрофагами как мышей линии C57BL/6 так и 9.3.19.8 ($67,6 \pm 1,8$ μ M и $54,9 \pm 1,0$ μ M, соответственно), а также активировал антимикобактериальную функцию макрофагов у мышей двух линий ($1153,5 \pm 188,9$ имп/мин и $1128,7 \pm 62$ имп/мин, соответственно). В системе с алогенным H2 Т-клетки CD27^{hi} и CD27^{lo} были не способны стимулировать продукцию NO $\cdot$ макрофагами, а также стимулировать бактериостатическую функцию последних.

Однако так как единичные Т-лимфоциты были способны индуцировать NO-независимый механизм активации макрофагов, мы предположили, что для реализации этого механизма необходима также и секреция растворимого фактора/факторов в среду культивирования. Инфицированные микобактериями макрофаги культивировали совместно с 24-часовыми супернатантами культур (макрофаги, микобактерии и Т-лимфоциты в соотношении макрофаг:Т-клетка=1:25). Было показано, что даже следовые количества супернатантов культур (3,7 мкл), содержащих эффе́кторы CD27^{lo} стимулировали антимикобактериальную активность макрофагов, причем при 11 мкл супернатанта в среде культивирования активные формы азота уже не обнаруживались. Для определения размера фактора далее мы использовали метод ультрафильтрации. Полученные фракции супернатантов культур (макрофаги, микобактерии и Т-лимфоциты) добавляли к инфицированным макрофагам перитонеального экссудата. Культивирование инфицированных макрофагов с фракцией, содержащей факторы с массой менее 1 кДа, не приводило ни к увеличению продукции NO $\cdot$ в культуре ни к уменьшению включения микобактериями [³H]-урацила. Фракция, содержащая факторы с массой более 10 кДа, только в высоких концентрациях активировала бактериостатическую функцию инфицированных макрофагов как и продукцию NO $\cdot$ последними. В то время как следовые количества фракции (1,5 мкл), содержащей факторы с массой от 3 до 10 кДа, индуцировали антимикобактериальную активность макрофагов, причем без увеличения продукции NO $\cdot$ последними.

Итак, было показано, что существуют два пути активации макрофагов Т-лимфоцитами $CD4^{+}$: NO-зависимый и NO-независимый. $CD27^{lo}$ намного эффективнее активируют как перитонеальные, так и «наивные» легочные макрофаги. Данный механизм активации не зависит ни от присутствия TNF-а, ни от выработки $NO\cdot$. Причем для активации Т-лимфоцитами антимикобактериальной функции макрофагов необходимо контактное взаимодействие клеток, после которого секретируется фактор с массой от 1 до 10 кДа, активирующий макрофаги.