

УДК: 612.112.3:577.7:576.852.211

АПОПТОЗ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН, ІНДУКОВАНИЙ МІКОБАКТЕРІЯМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ З РІЗНОЮ ВІРУЛЕНТНІСТЮ

Ільїнська І. Ф., Зубрійчук О. М.

ДУ "Національний інститут фізіатрії і
пульмонології ім. Ф. Г. Яновського Національної
академії медичних наук України", Київ, Україна

Відомо, що механізмам програмованої смерті (ПС) фагоцитуючих клітин належить одне з провідних місць у виникненні запалення, персистенції мікроорганізмів та звільненні організму хазяїна від екзогенних та ендогенних патогенів, в т.ч. мікобактерій туберкульозу (МБТ). Доведено, що окремі структурні компоненти МБТ можуть як ініціювати або посилювати ПС інфікованих ними фагоцитів, так і пригнічувати його. Індукція апоптозу бактеріальними факторами може здійснюватися або безпосередньо прямою активацією каспаз, або через їхній вплив на імунні механізми хазяїна, які контролюють інфекцію [5, 7].

Багато публікацій присвячено вивченню взаємозв'язків між апоптозом, індукованим МБТ, та такими біологічними характеристиками цього збудника, як вірулентність та життєздатність, проте результати цих робіт досить суперечливі: деякі автори вважають, що здатність ініціювати ПС клітин імунного захисту притаманна лише живим МБТ [9], інші стверджують, що як живі, так і вбиті мікобактерії (М.) здатні змінювати інтенсивність апоптозу фагоцитуючих клітин завдяки присутності певних субстанцій – модулів, котрі безпосередньо пов'язані з вірулентністю даного патогену [7]. Так, роботами Perskvist N. та співавт. (2002) було доведено, що інфікування МБТ свіжовиділених людських нейтрофілів (Нф) *in vitro* спричиняє їх швидку смерть з характерними морфологічними ознаками апоптозу та біохімічними перетвореннями, притаманними ПС клітин [10]. Цими ж авторами було визначено, що як вірулентні (H37Rv), так і атенуйовані (H37Ra) штами МБТ однаково ефективні в стимуляції апоптозу Нф. В той же час J.F. Sweeney та співавт. стверджують, що мікобактеріальні ліпополісахариди, котрі вважаються головними факторами вірулентності й активують Нф, одночасно захищають ці клітини від апоптозу [8]. H. Suttman та співавт. (2003) теж з'ясували, що стимуляція БЦЖ гальмує спонтанний апоптоз Нф, і що це супроводжується зміною експресії різних генів прозапальних цитокінів/хемокинів, рецепторів до них на цих клітинах та підвищеним синтезом мононуклеарних інтерлейкінів 1 і 8 та макрофагального протеїну запалення альфа (MIP-1) [12].

Аналогічна ситуація відбувається з даними щодо індукції МБТ апоптозу моноцитів/макрофагів. Так, Galietti F. та співавт. (2001) стверджують, що інфікування моноцитів (Мц) крові людини вірулентними МБТ типу *Humanus* спричиняє суттєве (у декілька разів) підвищення експресії проапоптичного протеїну p53 та кількості

апоптичних клітин, при інфікуванні мікобактеріями бичачого типу (*M. bovis*) ці зміни значно зменшуються, а мікобактерії пташиного типу (*M. avium*) зовсім не призводять до будь-яких змін ПС інфікованих ними Мц [11]. Проте більшість експериментальних даних свідчать на користь протилежної точки зору. Так, J. Keane та співавт. (2002) було показано, що зараження перитонеальних макрофагів (Мф) мишей BAlb/c саме авірулентними МБТ (H37Ra) призводить до їх апоптозу і супроводжується суттєвим пригніченням внутрішньоклітинного росту бацил [6]. Про значне посилення апоптозу альвеолярних Мф при їх зараженні *in vitro* МБТ H37Rv та H37Ra повідомляється в роботах J.S. Park та співавт., притому, за твердженням цих авторів, вірулентні МБТ H37Rv, Erdman, клінічний ізолят МБТ ВМС 96.1 та *M. bovis* дикого типу проявляють значно меншу проапоптичну дію, ніж авірулентні та атенуйовані штами (H37Ra, *M. bovis* BCG и *M. kansasii*) [13]. На наш погляд, ці розбіжності можуть бути обумовлені відмінністю умов проведення дослідження та обліку результатів, зокрема:

- використанням для індукції ПС *in vitro* клітин різного типу – Нф, Мц та Мф (перитонеальних та альвеолярних), різного походження – людських та мишачих, свіжовиділених і культуральних ліній;

- неоднаковим складом поживного середовища, в якому проводиться інкубація фагоцитів, у першу чергу за наявності та вмістом ростових факторів і типом антибіотиків;

- різним часом, протягом якого проводять індукцію ПС та інкубацію клітин;

- використанням різних доз МБТ;

- застосуванням неоднакових інструментальних засобів для обліку результатів (імуноферментного аналізу, проточної цитофлуориметрії, флуоресцентної мікроскопії), які у переважній більшості випадків полягають у детекції тих чи тих учасників різних шляхів та стадій ПС фагоцитуючих клітин (рис. 1), тобто того біохімічного каскаду, морфологічним втіленням якого виступає апоптоз: цитокінів та цитокінових рецепторів, протеїнів сімейства bcl-2, грануліну, каспаз, розривів ДНК, тощо.

З огляду на це метою даного дослідження було вивчення особливостей апоптозу фагоцитуючих клітин, індукованого *in vitro* та *in vivo* мікобактеріями туберкульозу з різною вірулентністю. Для цього передбачалося вирішити наступні задачі:

1. Дослідити особливості апоптозу перитонеальних макрофагів здорових тварин, індукованого *in vitro* живими та вбитими, вірулентними та авірулентними мікобактеріями туберкульозу.

2. У здорових осіб та хворих на туберкульоз вивчити особливості апоптозу нейтрофілів та моноцитів периферичної крові, індукованого *in vitro* вірулентними та авірулентними мікобактеріями туберкульозу.

3. Дослідити особливості апоптозу нейтрофілів та перитонеальних макрофагів тварин, інфікованих вірулентними та авірулентними мікобактеріями туберкульозу.

Матеріали та методи

Дослідження за кошти державного бюджету було проведено у межах виконання двох науково-дослідних робіт – 0107U001213 «Розробити раціональні схеми лікування хворих на туберкульоз легень в поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легень» і 0110U001212 «Визначити фактори ризику рецидивів туберкульозу легень та розробити оптимальні методи їх діагностики». Всього було проведено 3 серії дослідів.

Першу серію було присвячено вивченню апоптозу перитонеальних макрофагів, індукованого *in vitro* живими та вбитими, вірулентними та авірулентними МБТ у 10 інтактних безпородних мишей. На передодні дослідження макрофаги стимулювали 4 % крохмальним гелем за стандартною технікою [2].

В *другій серії* особливості апоптозу фагоцитуючих клітин, індукованого вірулентними та авірулентними МБТ *in vitro*, вивчали у 10 здорових осіб (волонтерів без клінічних ознак соматичної патології) та 14 хворих на вперше виявлений ТБ легень. Усі ці пацієнти перебували на стаціонарному лікуванні в ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського Національної академії медичних наук України" та проходили імунологічне обстеження в лабораторії клінічної імунології.

В *третьій серії* вивчали особливості апоптозу Нф та перитонеальних Мф мишей Balb/c, інфікованих вірулентними (H37Rv) та авірулентними (BCG) мікобактеріями туберкульозу. Цей дослід було проведено на 30 мишах лінії BALB/c, розподілених на 3 групи (по 10 особин в кожній): інтактні, інфіковані H37Rv та вакциновані BCG. Тварин було отримано з віварію ДУ "Національний інститут раку", їх утримували в стандартних умовах на стандартному раціоні харчування і брали в дослід після 2-тижневого карантину при відсутності жодних ознак захворювання. Маніпуляції з ними проводилися відповідно до Закону України № 3447-IV і Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових та інших цілей.

Модельовання експериментального ТБ здійснювалося шляхом внутрішньочеревного введення 0,5 мл фізіологічного розчину з 0,2 мг у двотижневої музейної культури МБТ типу Humanus штаму H37Rv, яку попередньо проводили через мурчаків для підвищення її вірулентності. Вакцинацію проводили вакциною БЦЖ (підприємство бактерійних препаратів НДІ епідеміології та мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї, серія 644, контроль 2351) – теж по 0,2 мг у 0,5 мл фізіологічного розчину внутрішньочеревно.

Імунологічні дослідження проводили на 30-й день інфекційного процесу.

Тварин присипляли ефірним наркозом. Кров забирали при декапітації в пробірки з 10 од. гепарину. В роботі використовували чисті популяції Нф та Мц тварин та людей, виділених послідовно на двох градієнтах щільності вікол-верографіну 1,090 та 1,078 г/см³ за стандартною технікою. Перитонеальні макрофаги також отримували стандартним способом [1–3].

Вміст фагоцитів у клітинних суспензіях перед постановкою імунологічних тестів підраховували у камері Горяєва на світловому мікроскопі Olympus VX41 та доводили поживним середовищем 199 до робочої концентрації 10⁶ клітин/мл.

Визначали: відносний та абсолютний вміст нейтрофілів у крові, в тому числі з апоптичною морфологією, їх спонтанний апоптоз, апоптоз моноцитів/макрофагів спонтанний та вплив на нього аутосорватки [1, 2]. Після інкубації фагоцитуючих клітин з живими та вбитими МБТ підраховували бактеріальне навантаження та відсоток апоптичних клітин, а показник індукції МБТ апоптозу (П_{БА}) розраховували за формулою:

$$П_{БА} = 100 * П_A / I_B (\%), \text{ де:}$$

П_{БА} – показник індукованого бактеріями апоптозу;

П_А – процент апоптичних фагоцитів;

I_Б – показник бактеріального навантаження.

В тестах *in vitro* використовували МБТ у дозі 100 мкг/мл. Облік результатів проводили за морфологічними ознаками: апоптичною вважали клітини з чіткою фрагментованими ядрами й ущільненою оболонкою.

Збір даних та їх статистичну обробку здійснювали на ПК Intel® Celer з використанням ліцензійних програмних продуктів, що входили до пакету Microsoft Office Professional 2000, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 17016297: після підтвердження нормальності розподілу показників використовувалися параметричні методи варіаційної статистики з визначенням середніх значень (M) та їх помилок (m), достовірність різниці між ними підтверджувалася за t-критерієм Ст'юдента (за мінімальний поріг достовірності було обрано значення $p < 0,05$) [4].

Результати та обговорення

При інкубації перитонеальних Мф *інтактних безпородних мишей* з вбитими МБТ H37Rv бактеріальне навантаження цих клітин сягало 74,3 %, що було у 2,6 рази вище, ніж при інкубації з живими МБТ. Проте відсоток апоптичних Мф виявився практично однаковим (24,9 % ± 2,4 % та 22,2 % ± 2,0%, відповідно), і таким чином, індукція апоптозу живими вірулентними МБТ була втричі потужнішою (табл. 1).

Таблиця 1.- Апоптоз перитонеальних макрофагів інтактних мишей, індукований *in vitro* живими та вбитими мікобактеріями туберкульозу з різною вірулентністю ($M \pm m$; $n = 10$)

Показники	Інкубація з мікобактеріями туберкульозу:			
	H37Rv		БЦЖ	
	живими	вбитими	живими	вбитими
Бактеріальне навантаження (%)	28,2 ± 2,2	74,3 ± 3,1*	38,5 ± 2,4*	31,6 ± 4,1 [#]
Відсоток апоптичних клітин (%)	24,9 ± 2,4	22,2 ± 2,0	30,4 ± 3,5	38,1 ± 3,9 [#]
Показник індукції апоптозу (%)	91,6 ± 10,2	30,0 ± 2,5*	80,5 ± 10,1	130,2 ± 14,4 ^{#*}

Примітки. * – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з живими МБТ H37Rv статистично підтверджено ($p < 0,05$); [#] – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з вбитими МБТ H37Rv статистично підтверджено ($p < 0,05$); * – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з живими БЦЖ статистично підтверджено ($p < 0,05$).

У той же час при інкубації перитонеальних Мф інтактних безпородних мишей з живими та вбитими авірулентними МБТ достовірної різниці бактеріального навантаження цих клітин визначено не було, а інтенсивність апоптозу в пробах з вбитою культурою БЦЖ дещо зростала. Показники індукції апоптозу Мф живими вірулентними та авірулентними МБТ були практично однаковими, але індукція апоптозу Мф вбитими мікобактеріями БЦЖ виявилася набагато сильнішою: вона сягала 130,2 % і в 4,3 рази перевищувала індукцію вбитими вірулентними МБТ та у 1,6 рази – живими БЦЖ (див. табл. 1).

У здорових осіб бактеріальне навантаження Нф периферичної крові після їх інкубації з вбитими МБТ H37Rv теж було більшим, ніж після інкубації з живими мікобактеріями, інтенсивність апоптозу в пробах з цими культурами також була однаковою, а показник його індукції живим збудником був вищим на 30 % (табл. 2).

Інкубація Нф здорових людей з вакцинною культурою МБТ зумовлювала зростання бактеріального навантаження цих клітин та їх апоптозу (більш виразного в пробах з вбитими БЦЖ), але показник індукції ними апоптозу Нф виявився меншим, ніж у вірулентних МБТ (див. табл 2).

Таблиця 2.- Апоптоз нейтрофілів та моноцитів здорових осіб і хворих на туберкульоз легень, індукований *in vitro* живими та вбитими вірулентними та авірулентними мікобактеріями туберкульозу ($M \pm m$)

Показники	Нейтрофіли		Моноцити	
	здорових осіб (n = 10)	хворих на туберкульоз (n = 14)	здорових осіб (n = 10)	хворих на туберкульоз (n = 14)
Бактеріальне навантаження				
H37Rv: – живими (%)	15,1 ± 1,5	20,9 ± 1,8*	14,7 ± 1,5	16,9 ± 1,1
– убитими (%)	20,2 ± 1,2 [*]	27,4 ± 2,1 ^{**}	15,8 ± 0,8	16,6 ± 1,1
БЦЖ: – живими (%)	42,2 ± 3,5 [*]	52,9 ± 3,0 ^{**}	28,7 ± 2,4 [*]	38,4 ± 3,2 ^{**}
– убитими (%)	34,2 ± 2,2 ^{o#}	43,6 ± 1,9 ^{o#}	34,4 ± 2,5 ^o	35,6 ± 2,2
Відсоток апоптичних клітин у пробах з МБТ H37Rv:				
– живими (%)	46,2 ± 4,5	58,6 ± 2,7*	35,4 ± 5,1	56,1 ± 2,6*
– убитими (%)	44,8 ± 3,7	49,1 ± 4,0 [*]	37,9 ± 4,2	55,4 ± 5,0 [*]
Відсоток апоптичних клітин у пробах з БЦЖ:				
– живими (%)	43,6 ± 4,3	50,4 ± 2,7 [*]	29,3 ± 2,2	40,7 ± 2,5 ^{**}
– убитими (%)	55,9 ± 4,3 [#]	49,1 ± 4,5	41,1 ± 4,0 [#]	44,5 ± 3,9 ^o
Показник індукції апоптозу H37Rv:				
– живими (%)	315,8 ± 29,7	300,6 ± 22,7	282,4 ± 20,9	342,5 ± 20,9*
– убитими (%)	225,8 ± 19,6 [*]	191,4 ± 18,5 [*]	240,4 ± 24,1	362,2 ± 46,7*
Показник індукції апоптозу БЦЖ:				
– живими (%)	108,3 ± 12,7 [*]	102,5 ± 12,2	107,5 ± 11,4 [*]	115,0 ± 11,4 [*]
– убитими (%)	173,8 ± 21,7 [#]	113,0 ± 9,5 [*]	125,3 ± 15,9 ^o	130,3 ± 14,9 ^o

Примітки: * – різницю між показниками у здорових та хворих на туберкульоз, статистично підтверджено ($p < 0,05$); ^o – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з живими МБТ H37Rv статистично підтверджено ($p < 0,05$); ^o – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з вбитими МБТ H37Rv статистично підтверджено ($p < 0,05$); [#] – різницю показника у порівнянні з показником у пробах з живими БЦЖ статистично підтверджено ($p < 0,05$).

При порівнянні показників бактеріального навантаження Мц периферичної крові здорових осіб після їх інкубації з МБТ Н37Rv та БЦЖ було зафіксовано їх збільшення у 2 рази в пробах з авірулентними мікобактеріями. Живі і вбиті вірулентні МБТ проявили однакову здатність до інфікування циркулюючих Мц, бактеріальне навантаження цих клітин живими та вбитими БЦЖ теж було схожим. Відсоток апоптичних Мц у пробах з живими та вбитими МБТ Н37Rv був майже однаковим і не відрізнявся від такого у пробах з живими БЦЖ, проте інактивація останніх зумовила достовірне збільшення відсотку апоптичних Мц (див. табл. 2). Таким чином, вірулентні МБТ продемонстрували здатність до обмеження поглинання них моноцитами здорових осіб і потужну індукцію апоптозу цих клітин, яка вдвічі перевищувала індукцію апоптозу Мц авірулентними МБТ (див. табл. 2).

У хворих на туберкульоз бактеріальне навантаження Нф після інкубації цих клітин з вірулентними та авірулентними МБТ виявилось більшим у 1,4–1,3 рази, а адекватне посилення апоптозу – лише у пробах с живими МБТ Н37Rv. Крім того, звертає на себе особливу увагу відсутність посилення індукції апоптозу Нф вбитими БЦЖ, яке мало місце у здорових осіб (див. табл. 2)..

Змін бактеріального навантаження Мц хворих на ТБ після їх інкубації з вірулентними МБТ виявлено не

було, проте індукція Н37Rv апоптозу цих клітин суттєво посилювалася (див. табл. 2).

Як і у здорових осіб, при ТБ спостерігалось збільшення інфікованості Мц в пробах з авірулентними МБТ, але воно було менш виразним і супроводжувалося посиленням інтенсивності апоптозу цих клітин лише при його індукції живими БЦЖ. Треба зазначити, що індукція БЦЖ апоптозу циркулюючих Мц хворих виявилася втричі слабшою, ніж індукція Н37Rv, вона не відрізнялася від такої у здорових осіб і посилювалася при використанні інактивованих мікобактерій (див. табл. 2).

У інфікованих тварин відбувалося зростання вмісту апоптичних Нф, яке корелювало з нейтрофіліозом і було більш виразним при вакцинації БЦЖ (табл. 3). При цьому змін спонтанного апоптозу нейтрофілів виявлено не було.

Вміст Мф у перитонеальному ексудаті тварин обох дослідних груп також збільшувався, і це збільшення також було більш виразним при вакцинному процесі (див. табл. 3). Змін спонтанного апоптозу перитонеальних Мф у інфікованих мишей не спостерігалось, але при експериментальному ТБ було зафіксовано суттєве посилення ПС цих клітин у присутності аутосерватки – індекс її проапоптичної дії сягав 78,7 %, тоді як при вакцинації БЦЖ цей показник виявився меншим вдвічі, а у інтактних тварин – в п'ятеро (див. Табл. 3).

Таблиця 3.- Апоптоз нейтрофілів та макрофагів мишей, інфікованих вірулентними та авірулентними мікобактеріями туберкульозу (M ± m)

Показники	Групи тварин		
	Інтактні (n = 10)	Інфіковані МБТ	
		Н 37Rv (n = 10)	БЦЖ (n = 10)
<i>Нейтрофіли периферичної крові:</i>			
Вміст нейтрофілів: (%) (10 ⁹ /л)	14,8 ± 1,9 1,04 ± 0,13	14,6 ± 2,1 1,72 ± 0,30*	16,1 ± 2,1 3,23 ± 0,53*#
Вміст апоптичних нейтрофілів (%) (10 ⁹ /л)	6,1 ± 0,7 0,07 ± 0,01	16,3 ± 1,5* 0,19 ± 0,02*	17,3 ± 1,3* 0,57 ± 0,12*#
Спонтанний апоптоз (%)	17,6 ± 0,6	17,8 ± 0,6	18,6 ± 1,0
<i>Макрофаги перитонеального ексудату:</i>			
Вміст макрофагів (%) (10 ⁹ /л)	44,0 ± 0,6 0,20 ± 0,01	48,9 ± 0,6* 0,51 ± 0,03*	78,1 ± 3,8*# 0,73 ± 0,09*#
Спонтанний апоптоз (%)	20,8 ± 0,3	21,9 ± 0,7	17,0 ± 2,1
Апоптоз з аутосерваткою (%)	24,0 ± 0,6	38,9 ± 0,6*	20,9 ± 2,0#
Індекс дії аутосерватки (%)	15,7 ± 2,6	78,7 ± 5,8*	37,8 ± 6,7*#

Примітки: * – різницю показника в порівнянні з показником інтактних тварин статистично підтверджено (p < 0,05);

– різницю показника тварин, вакцинованих БЦЖ, в порівнянні з показником тварин, інфікованих Н 37Rv, статистично підтверджено (p < 0,05).

Таким чином, вірулентним мікобактеріям туберкульозу притаманна потужна апоптогенна дія на фагоцитуючі клітини, а втрата збудником життєздатності та вірулентності сприяє її послабленню. Для запобігання надмірним втратам фагоцитів внаслідок апоптозу віруле-

нтні мікобактерії застосовують механізми, котрі перешкоджають інфікуванню цих клітин.

References

1. Апоптоз нейтрофілоцитів та його роль в патогенезі запальних процесів в легенях туберкульозного та

неспецифічного генезу / І.Ф. Льїнська, О.М. Рекалова, Л.В. Ареф'єва [та ін.] // Укр. пульмон. журнал. – 2007. – № 2. – С. 32–38

2. Льїнська І.Ф. Модуляція *S. aureus* та виділенням з нього клітинно-зв'язаним білком А функціонального стану фагоцитуючих клітин мишей з іритантним перитонітом / І.Ф. Льїнська, О.В. Гріценко, О.М. Зубрійчук. // Імунологія та алергологія. – 2008. – № 2. – С. 63–67.

3. Інтенсивність поглинання нативних та опсонізованих мікобактерій фагоцитуючими клітинами *in vitro* у хворих на туберкульоз та хронічні неспецифічні захворювання легень / І.Ф. Льїнська, О.М. Рекалова, Л.В. Ареф'єва, Ю.О. Матвієнко // Укр. пульмон. журн. – 2004. – № 4. – С. 42–47.

4. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: “Морион”, 2000. – 320 с.

5. Пичугин А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин, А.С. Апт // Пробл. туберкулеза и заболеваний легких. – 2005. – № 12. – С. 3–7.

6. Keane J. TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner / J. Keane, B. Shurtleff, H. Kornfeld // Tuberculosis (Edinb). – 2002. – V.82, № 2-3. – P. 55.

7. Lee J. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis / J. Lee, M. Hartman, H. Kornfeld // Yonsei Med. J. – 2009. – Vol. 50, № 1. – P. 1–11.

8. Lipopolysaccharide Protects Polymorphonuclear Leukocytes from Apoptosis via Tyrosine Phosphorylation-Dependent Signal Transduction Pathways / J. F. Sweeney P. K. Nguyen, G. M. Omann, D. B. Hinshaw // Journal of Surgical Research. – 1998. – Vol. 74, № 1. – P. 64–70.

9. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF (PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1 / Y. Moriwaki, N.A. Begum, M. Kobayashi [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 25. – P. 23065–23076.

10. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway / N. Perskvist, M. Long, O. Stendahl, L. Zheng // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168, № 12. – P. 6358–6365.

11. P53 expression in cultured blood human monocytes infected with mycobacterial strains / Galiotti F., E. Bollo, S. Cappia [et al.] // Panminerva Med. – 2001. – Vol. 43, № 4. – P. 249–255.

12. Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gueirin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis / H. Suttman, N. Lehan, A. Bohl, S. Brandau // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71, № 8. – P. 4647–4656.

13. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apop-

toxis in murine macrophages / J. S. Park, M.H. Tamayo, M.-Gonzalez-Juarrero [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2006. – Vol. 79. P. 80–86

УДК: 612.112.3:577.7:576.852.211
АПОПТОЗ ФАГОЦИТУЮЧИХ КЛІТИН,
ІНДУКОВАНИЙ МІКОБАКТЕРІЯМИ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ З РІЗНОЮ ВІРУЛЕНТНІСТЮ
Льїнська І. Ф. , Зубрійчук О. М.

Метою даного дослідження було вивчення особливостей апоптозу фагоцитуючих клітин, індукованого *in vitro* та *in vivo* мікобактеріями туберкульозу з різною вірулентністю. Для цього досліджували особливості апоптозу перитонеальних макрофагів, нейтрофілів та моноцитів периферичної крові, індукованого *in vitro* живими та вбитими МБТ Н37Rv та БЦЖ у інтактних тварин, здорових осіб і хворих на туберкульоз, а також особливості апоптозу нейтрофілів та перитонеальних макрофагів тварин, інфікованих МБТ Н37Rv та БЦЖ. Встановлено, що вірулентним мікобактеріям туберкульозу притаманна потужна апоптогенна дія на фагоцитуючі клітини, а втрата збудником життєздатності та вірулентності призводить до її послаблення. Показано, що індукція апоптозу мікобактеріями туберкульозу здійснюється як безпосередньо, так і опосередковано, ймовірно через їхній вплив на продукцію медіаторів міжклітинної взаємодії. З'ясовано, що для запобігання надмірним втратам фагоцитів внаслідок апоптозу вірулентні мікобактерії застосовують механізми, котрі перешкоджають інфікуванню цих клітин.

Ключові слова: апоптоз, перитонеальні макрофаги, нейтрофіли, моноцити, мікобактерії туберкульозу, вірулентність, життєздатність, експериментальний туберкульоз, вакцинація БЦЖ

УДК: 612.112.3:577.7:576.852.211
АПОПТОЗ ФАГОЦИТИРЮЮЩИХ КЛЕТОК,
ІНДУЦІРОВАННИЙ МІКОБАКТЕРІЯМИ
ТУБЕРКУЛЕЗА С РАЗНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТЮ
Льїнська І. Ф. , Зубрійчук О. М.

Целью данного исследования было изучение особенностей апоптоза фагоцитирующих клеток, индуцированного *in vitro* и *in vivo* микобактериями туберкулеза с разной вирулентностью. Для этого исследовали особенности апоптоза перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и моноцитов, индуцированного *in vitro* живыми и убитыми МБТ Н37Rv и БЦЖ у интактных животных, здоровых лиц и больных туберкулезом, а также особенности апоптоза нейтрофилов и перитонеальных макрофагов животных, инфицированных МБТ Н37Rv и БЦЖ. Установлено, что вирулентные микобактерии туберкулеза обладают мощным апоптогенным действием на фагоцитирующие клетки, а потеря возбудителем жизнеспособности и вирулентности приводит к его ослаблению. Показано, что индукция апоптоза микобактериями туберкулеза осуществляется как прямо, так и опосредованно, очевидно через их влияние на продукцию медиаторов межклеточного взаимодействия. Выявлено, что для предотвращения чрезмерных потерь фагоцитов вследствие апопто-

за вирулентные микобактерии применяют механизмы, препятствующие инфицированию этих клеток.

Ключевые слова: апоптоз, перитонеальные макрофаги, нейтрофилы, моноциты, микобактерии туберкулеза, вирулентность, жизнеспособность, экспериментальный туберкулез, вакцинация БЦЖ.

UDC: 612.112.3:577.7:576.852.211

PHAGOCYtic CELLS A APOPTOSIS INDUCED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS WITH DIFFERENT VIRULENCE

Ильинская И.Ф. , Zubriychuk O.M.

The purpose of this study was to investigate the characteristics of phagocytic cells apoptosis induced in vitro and in vivo by Mycobacterium tuberculosis with different virulence. For this aim the main feachers of apoptosis of peritoneal macrophages, neutrophyles, monocytes, induced in vitro by living and dead MBT H37Rv and BCG in intact animals,

healthy subjects and patients with tuberculosis were expected, as well as features of apoptosis of neutrophils and peritoneal macrophages of animals infected with MBT H37Rv and BCG. It was found that the virulent Mycobacterium tuberculosis have a powerful apoptogenic effect on phagocytic cells, and the loss of pathogen viability and virulence causes its weakening. It was demonstrated that the induction of apoptosis by Mycobacterium tuberculosis is realised both directly and indirectly, probably through their influence on the production of cell interaction mediators. It was detected that in order to limit excessive loss of phagocytes due to apoptosis, virulent mycobacteria use mechanisms that prevent infection of these cells.

Key words: apoptosis, peritoneal macrophages, neutrophils, monocytes, Mycobacterium tuberculosis, virulence, vitality, experimental tuberculosis, BCG vaccination.