

ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *MYCOBACTERIUM AVIUM*, ОБРАЗОВАНИЕ СКОПЛЕНИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ – ФАКТОР ПАТОГЕНЕЗА*

И. А. ЛИНГЕ, А. В. ДЯТЛОВ, Е. В. КОНДРАТЬЕВА, А. С. АПТ, Т. К. КОНДРАТЬЕВА

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва

При заражении *Mycobacterium avium* в легких генетически чувствительных к этой инфекции мышей линии В6 происходит накопление компактных агрегатов (фолликулов) В-лимфоцитов, с пиком на 11-13-й нед. после заражения. Физиологическая роль этих клеточных скоплений оставалась неясной. Применяв сегрегационный генетический анализ на сцепление аллелей гена *Slc11a1* с двумя признаками – количеством микобактерий в легких и накоплением В-клеточных фолликулов – на мышах F2 от скрещивания (В6 × I/St), удалось установить, что количество и размер фолликулов прямо коррелируют с размножением *M. avium* в легких. Таким образом, этот тип инфильтрации легочной ткани не обеспечивает защиты хозяина от инфекции, а является фактором патогенеза.

Ключевые слова: *Mycobacterium avium*, В-лимфоциты, воспаление легочной ткани, генетическая восприимчивость, патогенез.

B-LYMPHOCYTE AGGREGATION IN THE LUNG TISSUE IS A PATHOGENIC FACTOR IN EXPERIMENTAL INFECTION CAUSED BY *MYCOBACTERIUM AVIUM*

I. A. LINGE, A. V. DYATLOV, E. V. KONDRATIEVA, A. S. APT, T. K. KONDRATIEVA

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

When infecting the lungs with *Mycobacterium avium* of B6 line mice genetically susceptible to this infection the compact aggregates (follicles) of B-lymphocytes are formed with the peak at the 11-13th week after the infection. Physiological role of these cellular accumulations remained unclear. Having applied segregative genetic analysis to allele conglutination of *Slc11a1* gene with two signs – quantity of mycobacteria and accumulation of B-cellular follicles to the F2 mice from crossing (B6 × I/St), one managed to find out that the quantity and size of follicles directly correlate with *M. avium* replication in the lungs. Thus this type of the lung tissue infiltration does not protect the host from infection and it is a pathogenic factor.

Key words: *Mycobacterium avium*, B-lymphocytes, lung tissue inflammation, genetic predisposition, pathogenesis.

Комплекс микроорганизмов, называемый *Mycobacterium avium* complex, – это группа широко распространенных свободноживущих микобактерий, некоторые из которых становятся опасными возбудителями инфекций у людей с нарушенным Т-клеточным иммунным ответом [6, 8]. В состав комплекса входит до 100 видов и подвидов микобактерий, из которых 4 играют заметную роль в инфекционной патологии людей и животных, а из этих четырех особое место занимает подвид *M. avium hominissii* [7]. Эти бактерии обнаруживаются у 70% людей с нелеченым СПИДом и являются одной из важнейших причин смерти этих больных [11]. На фоне менее тяжелой несостоятельности иммунного ответа, например у детей и стариков, *M. avium* может вызывать хронические болезни легких [2, 5, 12].

В модельных системах, основанных на заражении инбредных мышей линии В6 и полученных от них мышей, несущих покаут-мутации в генах, участвующих в иммунном ответе, показано, что Т-клетки, отвечающие на антигены *M. avium*, выполняют как защитные, так и патогенетические функции. По поддержанию баланса между иммунологической защи-

той и патогенезом заболевания *M. avium* во многом похожи на *M. tuberculosis* [13]. В частности, наблюдается очевидное сходство между индуцированными *M. avium* гранулемами у мышей линии В6 и туберкулезными гранулемами у больных [3], а также развитие гипоксии в легких мышей линии В6 или I/St, чувствительных к *M. avium* и *M. tuberculosis* соответственно [10]. Кроме того, легочное воспаление инфицированных *M. avium* мышей линии В6 сопровождается образованием скоплений В-клеток (СВК) [10], похожих на В-фолликулы вторичных лимфоидных органов. Сходный тип ответа обнаруживается при туберкулезной инфекции у людей, макак и мышей [9, 14-16]. При этом если разница в образовании В-фолликулов между резистентными и чувствительными мышами при туберкулезе носит сугубо количественный характер, то при заражении *M. avium* проявляется по-настоящему контрастный фенотип: в легких мышей чувствительной к *M. avium* линии В6 образуются десятки СВК, а у мышей резистентной линии I/St они практически отсутствуют [9].

Цель исследования: установить, является ли образование скоплений В-клеток (СВК) дополни-

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 15-15-30020, ТКК).

тельной воспалительной реакцией и фактором патогенеза или же звеном иммунологической защиты, используя параллельное исследование контроля формирования СВК и уровня чувствительности к инфекции в зависимости от расщепления по гену *Slc11a1* у мышей.

Материалы и методы

Основным геном, определяющим уровень чувствительности к инфицированию *M. avium*, является ген *Slc11a1* (ранее *Nramp1*), определяющий эффективность выкачивания двухвалентных катионов, в частности Fe^{2+} , из фагосом макрофагов [4]. Функционально полноценный аллель R определяет устойчивый к инфекции фенотип, а мутантный аллель S (нонсенс-мутация, приводящая к замене G169D) – чувствительный фенотип.

Экспериментальные животные. В работе использованы чувствительные к *Mycobacterium avium* мыши линии C57BL/6Y/Cit (B6), резистентные к этой инфекции мыши I/StSnEgYCit(I/St), а также гибриды F2 (I/St × B6). Экспериментальных животных содержали в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях с доступом к корму и воде *ad libitum*.

Культура микобактерий и заражение. В работе использовали штамм 724 *Mycobacterium avium* из коллекции лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ», размножали в жидкой среде Дюбо (Difco) с добавлением oleата натрия (60 мг/л) и хранили в замороженном виде при 70°C в концентрации 10^8 КОЕ/мл. Для заражения животных применяли фильтрованную культуру микобактерий. Мышей инфицировали в аэрозольной камере фирмы GlasCol при предварительно подобранных условиях, обеспечивающих дозу инфекции $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мышь [10].

Определение аллелей гена *Slc11a1*. Аллели гена *Slc11a1* у мышей F2 (I/St × B6) определяли по длине фрагментов, полученных в результате расщепления ПЦР-продуктов нуклеазой BsmFI (NEB, Beverly, MA), специфически распознающей фрагмент с мутацией. Продукты ПЦР фрагмента гена *Slc11a1*, содержащего мутацию G169D в аллеле S, получали при следующих условиях: праймеры F 5'-TAGATGTTCAACACAACCCACAC-3', R 5'-AGGGGCTTTCCTCACCATAG-3', при следующих условиях: 95° – 2 мин (95° – 15 с, 58° – 15 с, 72° – 20 с) × 39, 72° – 7 мин. Аллельные варианты выявляли с помощью электрофореза в 4% агарозном геле.

Определение количества микобактерий в органах зараженных животных. Через 9 нед. после заражения мышей F2 определяли количество микобактерий в легких. Для этого стерильно выделяли правое легкое зараженных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серийные десятикратные разведения и высевали

на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco) по 50 мкл на чашку. Чашки инкубировали при 37°C, через 18-20 дней подсчитывали количество колоний на чашке и пересчитывали их количество на легкое (КОЕ/орган).

Иммуногистохимическое исследование легких. После заражения через 5-16 нед. у мышей B6 и через 9 нед. у мышей F2 выделяли левые легкие для гистохимического анализа. Замороженные срезы готовили на криотоме CryotomeH (ThermoShandon, Великобритания). В-лимфоциты выявляли с помощью окрашивания крысинными МАТ к CD19 (BD-PharMingen) с докрасиванием гематоксилин-эозином по ранее описанной методике [1]. Препараты анализировали и фотографировали на микроскопе Axioskop 40 с камерой AxioCamMRC5 (CarlZeiss, Германия). Анализ площади срезов скопления В-лимфоцитов оценивали относительно общей площади среза легкого по программе AxioVisio 4.8.

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPadPrism (GraphPadSoftware, США). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью метода Стьюдента (t-тест) и корреляционного анализа Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

В первой серии экспериментов оценили динамику изменения общего количества В-лимфоцитов в легких, выявляемых методом проточной цитометрии, и динамику формирования В-фолликулов, обнаруживаемых с помощью гистохимического метода, поскольку эти показатели могли и не совпадать. На рис. 1 представлены данные, показывающие, что максимальное количество В-клеток в легких обнаруживается через 9-11 нед. (рис. 1А), на тот же срок выявляется больше всего В-фолликулов (рис. 1В). В последующем легкие мышей исследовали через 9 нед. после заражения.

Экспрессия гена *Slc11a1* ограничена исключительно макрофагами и связана с функционированием именно этих клеток. Если бы оказалось, что у гомозиготных по рецессивному дефектному аллелю S животных наблюдается не только дефект контроля размножения *M. avium* (нарушение функции именно макрофагов), но и формируется больше СВК, в которых этот ген вообще не экспрессируется, можно было бы сделать вывод о патогенетическом характере данного типа ответа. Для анализа ассоциации носительства аллелей S и R гена *Slc11a1* с двумя фенотипами – размножение микобактерий в легких и формирование СВК – были получены мыши F2 (B6 × I/St), из которых были отобраны гомозиготные животные *Slc11a1^{S/S}* и *Slc11a1^{R/R}*. Из 45 полученных самок 16 имели генотип *Slc11a1^{S/S}*, а 14 – *Slc11a1^{R/R}*. Через 9 нед. после заражения был прове-

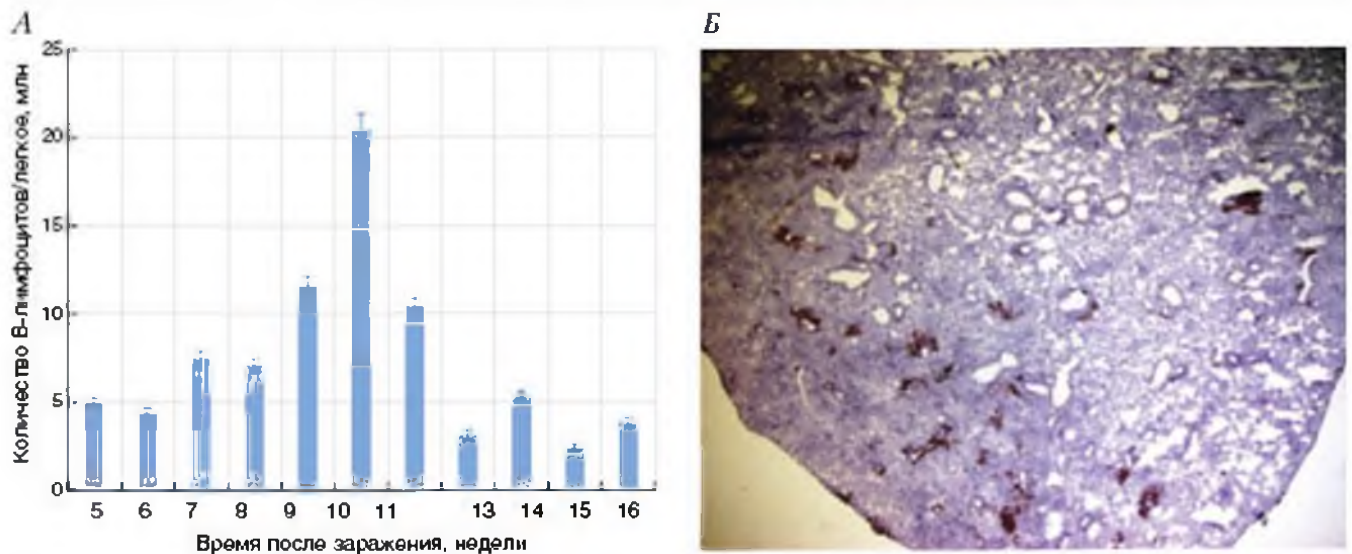


Рис. 1. Анализ количества (А) и локализации (Б) В-лимфоцитов в легких мышей линии В6 после аэрозольного заражения вирулентным штаммом *M. avium* 724 (1.5×10^3 КОЕ/мышь). А – оценка динамики накопления В-лимфоцитов (FACS-анализ клеток легкого по маркеру В-лимфоцитов B220) с 5-й по 16-ю нед. после заражения. Б – формирование В-фолликулов (иммуногистохимическое окрашивание криопрепаратов легкого антителами anti-CD19)

Fig. 1. Analysis of quantity (A) and localization (B) of B-lymphocytes in the lungs of B6 mice after aerosol inflammation by the virulent strain of *M. avium* 724 (1.5×10^3 CFU/mouse). A – evaluation of changes of B-lymphocytes aggregations (FACS-analysis of lung cells as per B220 marker of B-lymphocytes) from the 5th to 16th week after the infection. Б – formation of B-follicles (immuno-histological staining of cryopreparations of the lung with anti-CD19 antibodies)

ден гистологический анализ легких на выявление В-фолликулов и оценено количество высеваемых из легких бактерий для проверки уровня генетической восприимчивости к инфекции.

Как и ожидалось, генотип *Slc11a1^{S/S}* определял достоверно сниженную эффективность контроля размножения микобактерий в легких по сравнению с генотипом *Slc11a1^{R/R}* (рис. 2). При этом даже качественная оценка гистологической картины показала, что В-фолликулы у мышей *Slc11a1^{S/S}* формировались в большем количестве (рис. 3А), а количественный анализ (микрометрия) подтвердил, что разница достоверна (рис. 3Б, В, табл.). Формирование СВК в легких мышей *Slc11a1^{S/S}* прямо коррелирует с количеством высеваемых бактерий ($r = 0.82$, $p < 0.0001$). Таким образом, получено генетическое свидетельство того, что образование В-фолликулов в легких является фактором патогенеза, а не дополнительным способом защиты от инфекции.

Заключение

Образование В-фолликулов в инфицированной легочной ткани, очень напоминающее описанное для больных с тяжелой формой туберкулеза [16], происходит только у животных, которые имеют высокий уровень восприимчивости к определенному виду микобактерий (рис. 2, 3) [9]. Этот фенотип коррелирует с нарушенной способностью контролировать инфекцию и у человека, и у мыши. Углубленный анализ двух микобактериальных инфекций на мышах линий В6 и 1/St [1, 9, 10] и результаты

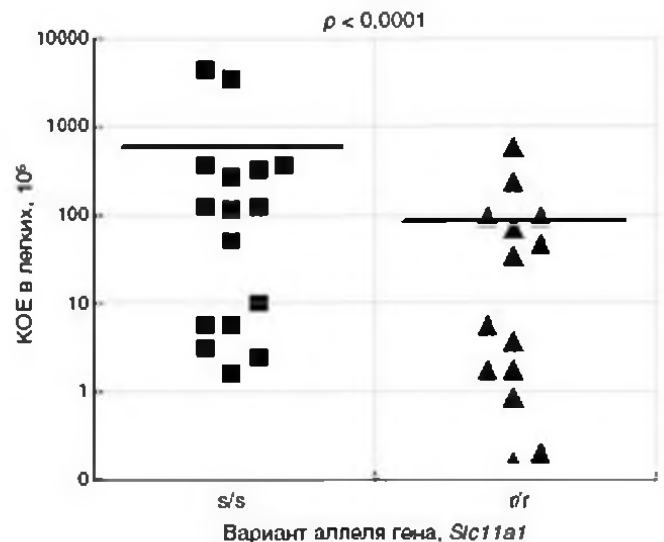
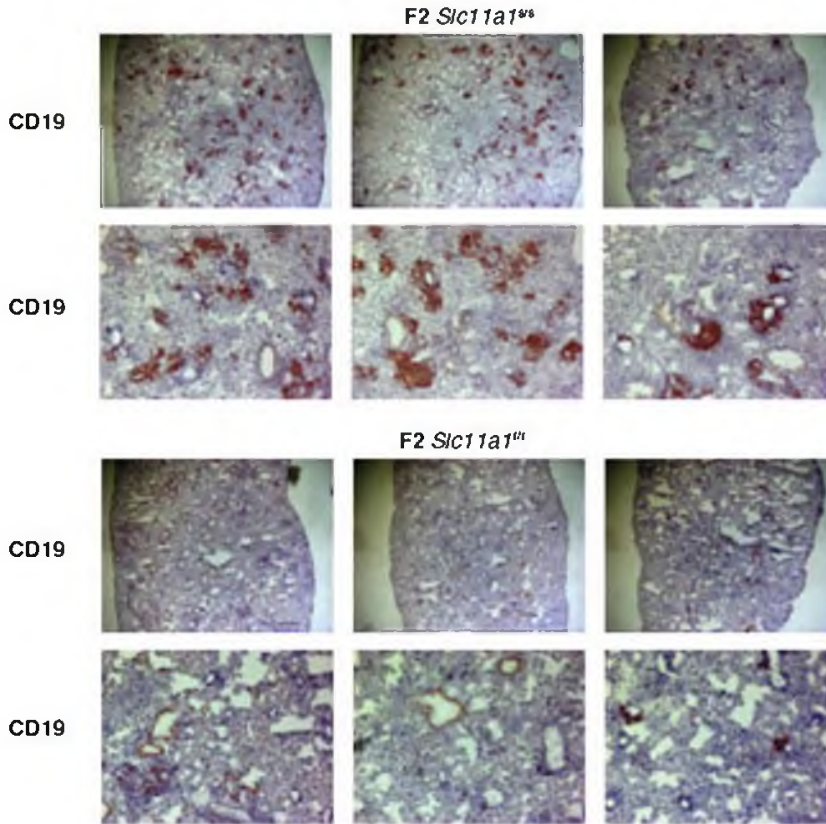


Рис. 2. Размножение *M. avium* в легких мышей регулируется аллелями гена *Slc11a1*. Количество колоний микобактерий достоверно ниже у носителей доминантного аллеля R по сравнению с гомозиготными носителями аллеля S

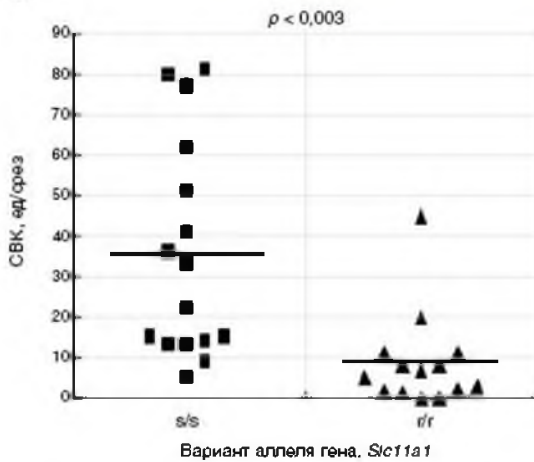
Fig. 2. Multiplication of *M. avium* in the lungs of mice are regulated by alleles of *Slc11a1* gene. Number of mycobacterial colonies is confidently lower in those bearing the dominating R allele compared to homozygous carriers of S alleles

данной работы позволили установить, что уровень генетической восприимчивости к конкретному виду микобактерий во многом определяет характер легочной патологии, что позволяет считать генетику хозяина важнейшим фактором патогенеза.

А



Б



В

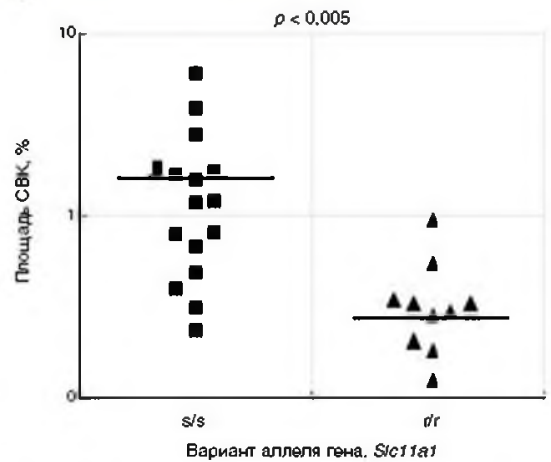


Рис. 3. Окраска срезов легкого антителами анти-CD19 (коричневые) выявляет существенные различия между носителями аллелей *S* и *R* среди мышей F2 (*1/St* × *B6*). А – общая гистологическая картина; увеличение × 2,5 (верхний ряд) и × 10 (нижний ряд). Б – обсчет количества фолликулов на легкое. В – площадь среза, занимаемая фолликулами у гомозигот *Slc11a1^{s/s}* и *Slc11a1^{r/r}* через 9 нед. после заражения

Fig. 3. The staining of pulmonary tissue sections with anti-CD19 (brown) detects the significant differences between those bearing *S* alleles and *R* alleles among F2 mice (*1/St* × *B6*). А – general histological pattern, amplification × 2.5 (upper row) and × 10 (lower row). Б – calculation of follicles number per lung. В – square of the area occupied by follicles in homozygotes of *Slc11a1^{s/s}* and *Slc11a1^{r/r}* in 9 weeks after infection

Таблица. Количественная оценка образования В-фолликулов*

Table. Quantitative evaluation of B-follicle formation

Количество В-фолликулов на срез легкого	Количество мышей, гомозиготных по аллелям гена <i>Sic11a</i>	
	s/s	d/d
< 5	0	6
5 < 10	7	6
> 20	9	2

Примечание: * – срезы легкого всех 30 гомозиготных мышей F2 окрашивали антителами анти-CD19 и подсчитывали количество фолликулов на срез. Результаты демонстрируют отсутствие срезов с малым количеством фолликулов и значительное преобладание срезов с большим числом фолликулов у мышей с генотипом *Sic11a*^{+/+}.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьева Т. К., Линге И. А., Кондратьева Е. В. и др. Образование компактных скоплений В-лимфоцитов в легочной ткани при микобактериальных инфекциях у мышей зависит от продукции этими клетками TNF и не является фактором иммунологической защиты хозяина // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 12. – С. 1659-1665.
2. Benson C. A. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome // Clin. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 3. – P. S218-S222.
3. Ehlers S., Benini J., Held H.-D. et al. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology // J. Exp. Med. – 2001. – Vol. 194. – P. 1847-1859.
4. Forbes J. R., Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions // Trends Microbiol. – 2001. – Vol. 9. – P. 397-405.
5. Griffith D. E. Nontuberculous mycobacteria // Curr. Opin. Pulm. Med. – 1997. – Vol. 3. – P. 139-145.
6. Horsburgh C. R. Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome // New Engl. J. Med. – 1991. – Vol. 324. – P. 1332-1338.
7. Ignatov D., Kondratieva E., Azhikina T. et al. *Mycobacterium avium*-triggered diseases: pathogenomics // Cell Microbiol. – 2011. – Vol. 14. – P. 808-818.
8. Inderlied C. B., Kemper C. A., Bermudez L. E. The *Mycobacterium avium* complex // Clin. Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 6. – P. 266-310.
9. Kondratieva E., Logunova N., Majorov K. et al. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. avium* // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 5. – P. e10515.
10. Kondratieva E. V., Evstifeev V. V., Kondratieva T. K. et al. I/St mice hyper susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* are resistant to *M. avium* // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75. – P. 4762-4768.
11. Nightingale S. D., Byrd L. T., Southern P. M. et al. Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients // J. Infect. Dis. – 1992. – Vol. 165. – P. 1082-1085.
12. Nolt D., Michaels M. G., Wald E. R. Intrathoracic disease from nontuberculous mycobacteria in children: two cases and a review of the literature // Pediatrics. – 2003. – Vol. 112. – P. e434.
13. Ottenhoff T., Kaufmann S. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8. – P. e1002607.
14. Phuah J. Y., Mattila J., Lin P. L. et al. Flynn JL. Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with *mycobacterium tuberculosis* // Am. J. Pathol. – 2012. – 181, № 2. – P. 508-514.
15. Tsai M. C., Chakravarty S., Zhu G. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension // Cell. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 218-232.
16. Ulrichs T., Kosmiadi G. A., Trusov V. et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung // J. Pathol. – 2004. – 204. – P. 217-228.

REFERENCES

1. Kondratieva T.K., Linge I.A., Kondratieva E.V. et al. The formation of compact aggregation of B-lymphocytes in the lung tissue in case of mycobacterial infections in mice depends on the TNF production by these cells and it is not the factor of immunological defense of the host. *Biokhimiya*, 2014, vol. 79, iss. 12, pp. 1659-1665. (In Russ.)
2. Benson C.A. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, 1994, vol. 3, pp. S218-S222.
3. Ehlers S., Benini J., Held H.-D. et al. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, pp. 1847-1859.
4. Forbes J.R., Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.*, 2001, vol. 9, pp. 397-405.
5. Griffith D.E. Nontuberculous mycobacteria. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 1997, vol. 3, pp. 139-145.
6. Horsburgh C.R. Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *New Engl. J. Med.*, 1991, vol. 324, pp. 1332-1338.
7. Ignatov D., Kondratieva E., Azhikina T. et al. *Mycobacterium avium*-triggered diseases: pathogenomics. *Cell Microbiol.*, 2011, vol. 14, pp. 808-818.
8. Inderlied C.B., Kemper C.A., Bermudez L.E. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1993, vol. 6, pp. 266-310.
9. Kondratieva E., Logunova N., Majorov K. et al. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. avium*. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 5, pp. e10515.
10. Kondratieva E.V., Evstifeev V.V., Kondratieva T.K. et al. I/St mice hyper susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* are resistant to *M. avium*. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, pp. 4762-4768.
11. Nightingale S.D., Byrd L.T., Southern P.M. et al. Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect. Dis.*, 1992, vol. 165, pp. 1082-1085.
12. Nolt D., Michaels M.G., Wald E.R. Intrathoracic disease from nontuberculous mycobacteria in children: two cases and a review of the literature. *Pediatrics*, 2003, vol. 112, pp. e434.
13. Ottenhoff T., Kaufmann S. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogens*, 2012, vol. 8, pp. e1002607.
14. Phuah J.Y., Mattila J., Lin P.L. et al. Flynn J.L. Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with *mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Pathol.*, 2012, 181, no. 2, pp. 508-514.
15. Tsai M.C., Chakravarty S., Zhu G. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.*, 2006, vol. 8, pp. 218-232.
16. Ulrichs T., Kosmiadi G.A., Trusov V. et al. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J. Pathol.*, 2004, 204, pp. 217-228.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,
107564, Москва, Яузская аллея, д. 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.

Линге Ирина Андреевна
старший научный сотрудник.
E-mail: iralinge@gmail.com

Дятлов Александр Валерьевич
аспирант.
E-mail: dyatloff@gmail.com

Кондратьева Елена Валерьевна
старший научный сотрудник.
E-mail: elyonakondratieva74@gmail.com

Апт Александр Соломонович
заведующий лабораторией.
E-mail: asapt@aha.ru

Кондратьева Татьяна Константиновна
ведущий научный сотрудник.
E-mail: tanya.kondratieva.47@mail.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Central Tuberculosis Research Institute,
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564.
Phone: +7 (499) 785-90-72.

Irina A. Linge
Senior Researcher.
E-mail: iralinge@gmail.com

Alexander V. Dyatlov
post-graduate student.
E-mail: dyatloff@gmail.com

Elena V. Kondratieva
Senior Researcher.
E-mail: elyonakondratieva74@gmail.com

Alexander S. Apt
Laboratory Head.
E-mail: asapt@aha.ru

Tatiana K. Kondratieva
Senior Researcher.
E-mail: tanya.kondratieva.47@mail.ru

Поступила 11.11.2015

Submitted on 11.11.2015