

КЛЕТКИ С МИКОБАКТЕРИЯМИ В ГРАНУЛЕМАТОЗНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ МЫШЕЙ НА ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ *EX VIVO*

Е.Г. Уфимцева

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Цель работы состояла в получении *ex vivo* монослойных культур клеток, мигрировавших из индивидуальных гранул, изолированных из селезенок мышей линии Balb/c спустя 1 и 2 месяца после заражения вакциной БЦЖ, и оценке вклада клеток различного типа в развитие гранулематозного воспаления и анализа содержания ими VCG-микобактерий на латентном этапе туберкулезной инфекции. Гранулемы были представлены в основном макрофагами, количество которых варьировало как в одной мышце, так и между мышцами. Гранулемы также содержали дендритные клетки (в среднем 10% от макрофагов гранулем) и лимфоциты. В некоторых гранулемах мышей на всех сроках инфекции наблюдали фибробласты, нейтрофилы, эозинофилы, многоядерные клетки Пирогова–Лангханса и мегакариоциты с тромбоцитами. Количество этих клеток также варьировало между гранулемами. Кислотоустойчивые VCG-микобактерии обнаружили только в макрофагах, дендритных клетках и клетках Пирогова–Лангханса гранулем мышей. Мыши различались как по количеству клеток с VCG-микобактериями в гранулемах, так и по количеству гранул с VCG-содержавшими клетками. Предложенная модель гранулемных клеток мышей в культуре *ex vivo* может быть использована для изучения взаимоотношений клеток-хозяев с микобактериями для поиска новых путей и методов воздействия на внутриклеточные патогены на латентном этапе туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: латентная туберкулезная инфекция, вакцина БЦЖ, VCG-микобактерии, гранулема, макрофаги, дендритные клетки, клетки Пирогова–Лангханса.

Введение

Туберкулез — одно из распространенных инфекционных заболеваний человека, уносящее ежегодно до 2 млн жизней. Треть населения Земли инфицирована патогенными микобактериями, способными вызывать как острую болезнь человека и животных, так и бессимптомную латентную инфекцию. Реактивация латентного туберкулеза в течение жизни происходит примерно у 10% его носителей, что соответствует возникновению 8–9 млн новых случаев туберкулеза в мире ежегодно. В основе развития туберкулеза лежит внутриклеточная персистенция микобактерий в хронических воспалительных образованиях, называемых гранулемами [1, 3, 9, 13]. Гранулемы — это структурные скопления иммунных клеток, прежде всего макрофагов,

содержащих микобактерии. Гранулемы, с одной стороны, ограничивают распространение инфекции по организму, а с другой, обеспечивают ее латентное состояние с возможностью последующей реактивации. Макрофаги — клетки врожденного звена иммунного ответа, участвующие в первичной защитной реакции организма на внедрение инфекционных агентов. Неспособность макрофагов разрушать в фагосомах поглощенные микобактерии лежит в основе риска развития туберкулезного процесса [1, 3, 9]. Исследование механизмов установления латентного состояния инфекции в обход иммунного надзора со стороны организма-хозяина является высокоприоритетным для борьбы с туберкулезом в связи с появлением и широким распространением высоковирулентных и лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий.

Автор:

Уфимцева Е.Г., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск

Адрес для переписки:

Уфимцева Елена Геннадьевна
630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН.
Тел.: (913) 480-62-11. E-mail: ufim1@ngs.ru

поступила в редакцию 03.04.2013
принята к печати 08.04.2013

© Уфимцева Е.Г., 2013

Несмотря на важность контроля количества и состояния микобактерий в фазе латентной туберкулезной инфекции, об их содержании и функциональном состоянии в клетках гранулем млекопитающих известно очень мало. Исследование гранулем проводилось в основном гистологическими методами в тканях человека и животных и на моделях искусственно-созданных гранулем, что в целом не позволило изучить ни их точного клеточного состава, ни содержания микобактерий в клетках [6–8, 10]. Использование техники прижизненной визуализации гранулем в печени мышей, инфицированных аттенуированным штаммом *Mycobacterium bovis* вакцины Кальметта–Герена (*bacillus Calmette–Guérin*, BCG), позволило проследить за динамичным поведением макрофагов и лимфоцитов в гранулемных структурах, но также без детального анализа зараженности клеток микобактериями на стадии латентной инфекции [2]. Следовательно, требуется создание новых систем и моделей для изучения взаимоотношений клеток-хозяев с внутриклеточными патогенами с целью поиска новых путей и методов воздействия на микобактерии туберкулеза.

Целью настоящего исследования было получение *ex vivo* монослойных культур клеток, соответствующих отдельным гранулемам, изолированным из селезенок мышей, и анализ содержания клеток с BCG-микобактериями в гранулемах с оценкой вклада клеток различного типа в развитие гранулематозного воспаления на латентной стадии туберкулезной инфекции мышей.

Материалы и методы

Животные. В работе использовали мышей линии Balb/c в возрасте двух месяцев к началу инфицирования. Мыши были получены из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и содержались в виварии в соответствии со всеми нормами ухода за животными.

Бактерии вакцинного штамма *M. bovis* фабричного производства (вакцина БЦЖ-1, ООО «Аллерген», г. Ставрополь, Россия) использовали в дозе 0,5 мг на мышью в 0,9% растворе NaCl. Мышей инфицировали в хвостовую вену в количестве 100 мкл суспензии на мышью.

Выделение гранулем и культивирование *ex vivo*. Гранулемы из селезенок мышей изолировали спустя 1 и 2 месяца после инфицирования по методу, подробно описанному в [11], без использования коллагеназы. Для выделения гранулем органы, взятые индивидуально от каждого животного, гомогенизировали в 5 мл среды RPMI 1640 с 50 мкг/мл гентамицина. Гранулемы из гомогенатов органов выделяли центрифугированием при 400 об/мин с трехкратной отмывкой в среде RPMI 1640 с 50 мкг/мл гентамицина. Осадок гранулем в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки плодов ко-

ров, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина, высаживали в невысокой плотности в лунки 24-луночных планшетов (Orange Scientific, Бельгия) с покровными стеклами на дне и культивировали в 0,5 мл среды в течение 2–5 суток при +37°C в атмосфере 5% CO₂. Все реактивы для выделения и культивирования клеток получены из ООО «Биолот» (Санкт-Петербург). Перед использованием эмбриональная сыворотка плодов коров была инактивирована прогреванием при +56°C в течение 30 мин.

Окраска клеток на микобактерии. После 2–5 суток в культуре *ex vivo* клетки гранулем на покровных стеклах фиксировали в 4% растворе формалина на фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для выявления кислотоустойчивых BCG-микобактерий препараты с клетками гранулем окрашивали по методу Циля–Нильсена. Клетки докрасивали в 1% растворе метилового синего (Sigma, США). Для контроля окраски использовали препараты перитонеальных макрофагов интактных мышей Balb/c.

Микроскопия. Цитологические препараты исследовали в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН с помощью микроскопа AxioScope2plus (Zeiss), фотографировали с использованием цифровой камеры AxioCam HRc (Zeiss), анализировали с помощью программы AxioVigion 4.7 (Zeiss).

Статистическую обработку результатов провели с использованием пакета программ MS Excel 2007 (Microsoft). Достоверность различий оценили по t критерию Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Гранулемы из селезенок мышей выделили спустя 1 месяц (3 мыши под номерами 3, 4, 5) и 2 месяца (9 мышей под номерами 4, 8, 9, 10, 13, 21, 22, 23, 24) после инфицирования вакциной БЦЖ. К моменту изолирования гранулем ни у одной из мышей не наблюдали развития острой туберкулезной инфекции. Следовательно, гранулемы мышей получили в латентной фазе ее развития. Изолированные гранулемы культивировали *ex vivo* в течение нескольких суток в невысокой плотности с использованием прогретой эмбриональной сыворотки с инактивированными белками комплемента. Начало миграции клеток из многослойных гранулематозных структур наблюдали с первого дня их культивирования (рис. 1а, вклейка). На 2–5 сутки получили монослойные культуры распластанных на стеклянной подложке клеток, мигрировавших из индивидуальных гранулем (рис. 1б, г, вклейка).

Монослойная культура клеток, соответствовавшая отдельному гранулематозному образованию, далее по тексту обозначена как «гранулема». Гранулемы, полученные из селезенок мышей спустя 1 и 2 месяца после инфицирования, далее по тексту обозначены как «одно-

месячные» (1-Гран) и «двухмесячные» (2-Гран) соответственно. Гранулемы выделили из селезенки всех мышей, инфицированных вакциной БЦЖ, затем проанализировали их клеточный состав и оценили содержание кислотоустойчивых VCG-микобактерий в клетках.

Гранулематозные воспалительные образования мышей состояли в основном из макрофагов разной морфологии (рис. 1а-е, вклейка). Количество макрофагов в гранулемах мышей варьировало от нескольких десятков до нескольких сотен (рис. 1в, д, вклейка). Среднее число макрофагов в 1-Гран (3 мыши, $n = 183$) и 2-Гран (9 мышей, $n = 374$) мышей достоверно не изменилось и составило $59,93 \pm 6,92$ и $70,15 \pm 5,33$ клеток соответственно.

Число клеток других типов в гранулемах было значительно меньше, чем макрофагов, их количество варьировало. Соответственно, оценку их содержания провели в процентах относительно числа макрофагов в гранулемах, приняв количество макрофагов в каждой гранулеме за 100%. Данные по содержанию клеток разного типа в 1-Гран (3 мыши, $n = 183$) и 2-Гран (9 мышей, $n = 374$) суммированы в табл. 1. Помимо макрофагов в составе мышинных гранулем на латентной стадии развития туберкулезной инфекции выявили дендритные клетки, лимфоциты, фибробласты, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты с тромбоцитами и многоядерные клетки Пирогова–Лангханса. Почти во всех исследованных гранулемах были обнаружены дендритные клетки и лимфоциты. В гораздо меньшем числе гранулем наблюдали клетки других типов. Среднее количество дендритных клеток в гранулемах из селезенки мышей в ходе латентной VCG-инфекции не изменилось и составило примерно 10% от макрофагов как в 1-Гран, так и в 2-Гран мышей. Среднее число лимфоцитов в 1-Гран и 2-Гран достоверно не изменилось. В составе небольшого числа гранулем наблюдали фибробласты, сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы. Эозинофилы в повышенном количестве обнаружили в 1-Гран мышей.

Как правило, многоядерные клетки Пирогова–Лангханса не выявляли в мышинных гранулемах, в отличие от гранулем человека, где они присутствовали в большом количестве [13]. Однако мы обнаружили клетки Пирогова–Лангханса и с 6–15, и с 30–60 ядрами как на периферии, так и в центре монослойных культур гранулем мышей (рис. 1в, вклейка). В 1-Гран и 2-Гран мышей также выявили мегакариоциты (рис. 1б, вклейка). Наблюдали образование тромбоцитов путем фрагментации цитоплазмы мегакариоцитов гранулем. Ранее [1, 3, 9, 13] клетки этого типа никогда не выделяли в составе гранулем млекопитающих. Заметим, что в культуре *ex vivo* гранулем с морфологическими признаками гибели клеток ни по механизмам апоптоза, ни по пути некроза не обнаружили.

С помощью окраски Циля–Нильсена оценили содержание кислотоустойчивых микобактерий с неповрежденной клеточной стенкой в гранулемах мышей на латентной стадии туберкулезной инфекции. VCG-микобактерии обнаружили в макрофагах и, реже, в дендритных клетках мышинных гранулем (рис. 1а-е, вклейка). Клетки Пирогова–Лангханса также содержали VCG-микобактерии. Из всех проанализированных нейтрофилов гранулем разных мышей микобактерии наблюдали в единственной клетке. В других типах клеток гранулем микобактерий не выявили, так же как и в перитонеальных макрофагах интактных мышей. В гранулемах мышей наблюдали клетки с разным числом VCG-микобактерий (рис. 1а, б, г, е, вклейка). В данной работе оценили общее количество гранулем с клетками, имевшими микобактерии, и число клеток с микобактериями в гранулемах разных мышей (табл. 2). Мыши отличались как по количеству гранулем, содержащих макрофаги с VCG-микобактериями, так и по числу клеток с микобактериями в гранулемах. Гранулем, в каждом макрофаге которых определили бы кислотоустойчивые VCG-микобактерии, не наблюдали вообще. Гранулемы с VCG-содержавшими дендритными клетками выявили, во-первых, не во

ТАБЛИЦА 1. КЛЕТЧНЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛЕМ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЕЛЕЗЕНОК МЫШЕЙ СПУСТЯ 1 МЕСЯЦ (1-ГРАН) И 2 МЕСЯЦА (2-ГРАН) ПОСЛЕ БЦЖ-ИНФИЦИРОВАНИЯ

Клетки гранулем	Количество гранулем с клетками*, %		Количество клеток в гранулемах**, %	
	1-Гран	2-Гран	1-Гран	2-Гран
Макрофаги	100,0	100,0	100,0	100,0
Дендритные клетки	$92,69 \pm 1,24$	$94,48 \pm 1,83$	$9,09 \pm 0,66$	$9,93 \pm 0,48$
Лимфоциты	$94,13 \pm 1,93$	$85,33 \pm 7,42$	$43,15 \pm 4,44$	$32,88 \pm 1,62$
Фибробласты	$7,7 \pm 6,1$	$16,93 \pm 5,64$	$5,38 \pm 1,4$	$7,97 \pm 0,41$
Нейтрофилы	$7,39 \pm 5,89$	$29,81 \pm 9,43$	$1,54 \pm 0,11$	$2,52 \pm 0,16$
Эозинофилы	$20,89 \pm 15,16$	$6,02 \pm 2,99$	$7,46 \pm 1,35^{\#}$	$1,95 \pm 0,23^{\#}$
Мегакариоциты	$11,71 \pm 7,73$	$6,66 \pm 2,26$	$2,62 \pm 1,22$	$1,51 \pm 0,18$
Клетки Пирогова–Лангханса	$1,1 \pm 0,58$	$4,24 \pm 1,59$	$1,02 \pm 0,1$	$1,52 \pm 0,08$

Примечание. Данные представлены как средние значения *количества гранулем с определенным типом клеток в процентах от общего числа гранулем и **количества клеток определенного типа в процентах от макрофагов гранулем с указанием стандартной ошибки. $^{\#} P < 0,05$

ТАБЛИЦА 2. КЛЕТКИ С VCG-МИКОБАКТЕРИЯМИ В ГРАНУЛЕМАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЕЛЕЗЕНОК МЫШЕЙ СПУСТЯ 1 МЕСЯЦ (1-ГРАН) И 2 МЕСЯЦА (2-ГРАН) ПОСЛЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВАКЦИНОЙ БЦЖ

Мыши	n*	Макрофаги		Дендритные клетки	
		n**	%***	n**	%***
3 (1-Гран)	34	34	28,54±3,28	3	12,39±3,64
4 (1-Гран)	44	43	19,4±1,49	2	13,89±2,26
5 (1-Гран)	9	7	23,71±7,31	–	–
4 (2-Гран)	96	79	18,48±1,6	11	32,58±10,33
8 (2-Гран)	36	34	18,93±4,54	3	8,89±0,99
9 (2-Гран)	60	50	19,97±4,05	4	18,53±6,99
10 (2-Гран)	27	27	19,29±1,69	2	39,29±8,75
13 (2-Гран)	32	30	12,24±1,47	5	28,29±8,54
21 (2-Гран)	9	9	32,1±8,75	–	–
22 (2-Гран)	41	27	5,21±0,69	4	30,66±11,33
23 (2-Гран)	52	52	26,2±1,61	16	16,24±2,8
24 (2-Гран)	24	15	4,98±1,59	2	8,7±4,55

Примечание. *число проанализированных гранул; **количество гранул с клетками, содержащими VCG-микобактерии; ***среднее число клеток с VCG-микобактериями в процентах от общего числа клеток данного типа в гранулемах с указанием стандартной ошибки.

всех проанализированных мышах, во-вторых, в гораздо меньшем количестве гранул, чем гранулемы с макрофагами, имевшими микобактерии (табл. 2). Пять многоядерных клеток Пирогова–Лангханса из 16 исследованных содержали VCG-микобактерии.

1-Гран (3 мыши, n = 87) и 2-Гран (9 мышей, n = 377) мышей достоверно не отличались по среднему количеству гранул с VCG-содержавшими макрофагами и дендритными клетками (рис. 2). В 1-Гран и 2-Гран мышей не наблюдали изменения среднего числа макрофагов с микобактериями в гранулемах (рис. 3). Однако среднее количество дендритных клеток с микобактериями значительно увеличилось в 2-Гран мышей (рис. 3).

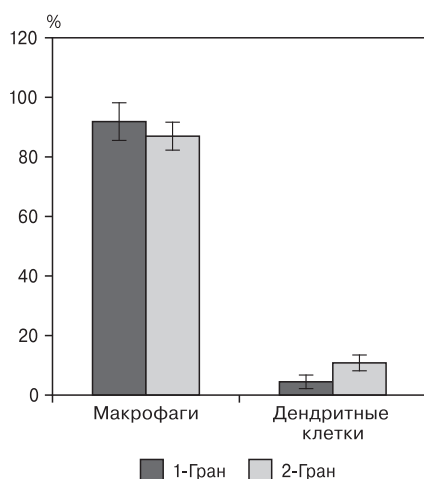


Рисунок 2. Среднее число гранул с VCG-содержавшими клетками в процентах от общего числа проанализированных гранул, полученных из селезенок мышей спустя 1 месяц (1-Гран) и 2 месяца (2-Гран) после инфицирования вакциной БЦЖ

Таким образом, в культуре *ex vivo* в гранулемах всех зараженных вакциной БЦЖ мышей на стадии латентной туберкулезной инфекции выявили клетки с кислотоустойчивыми микобактериями. Мыши различались как по количеству гранул с VCG-содержавшими макрофагами и дендритными клетками, так и по числу клеток в гранулемах, имевших микобактерии.

Обсуждение

Получение монослойных культур клеток, мигрировавших в культуре *ex vivo* из гранул зараженных вакциной БЦЖ мышей и соответствовавших отдельному гранулематозному образованию, позволило проанализировать клеточный состав гранул и содержание ими клеток с микобактериями на стадии латентной туберкулезной инфекции. Гетерогенность по количеству полученных гранул и по числу клеток разных типов в них, наблюдавшаяся для всех мышей, позволяет предположить, что как индивидуальные особенности организма-хозяина, так и специфика микроокружения гранул могут влиять на становление и развитие врожденного иммунного ответа животных при VCG-инфицировании.

Сохранение замкнутой структуры туберкулезных гранул является одной из ключевых проблем в изучении распространения микобактерий по органам и тканям организма животных. В прижизненных исследованиях гранул в печени мышей на латентной стадии VCG-инфекции обнаружили образование макрофагами неподвижной скэффолд-структуры с мигрирующими внутри нее лимфоцитами [2]. Культивирование *ex vivo* изолированных гранул в полной ростовой среде не привело к миграции клеток из плотных гранулематозных структур [6]. Однако использование эмбриональной сыворотки с инактивированными белками комплемента способствовало активной миграции клеток всех

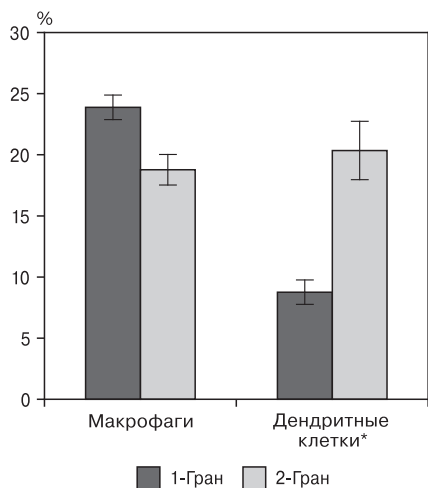


Рисунок 3. Среднее число клеток, содержащих BCG-микобактерии, в процентах от общего числа проанализированных клеток соответствующего типа в гранулемах, полученных из селезенки мышей спустя 1 месяц (1-Гран) и 2 месяца (2-Гран) после инфицирования вакциной БЦЖ. *P < 0,01

типов из гранул мышей в культуре *ex vivo*. Вероятно при определенных условиях клетки гранулем способны также активно перемещаться по органам и тканям организма-хозяина. В целом, малая изученность процессов образования гранул, их состава и ротации клеток пока не позволяет судить о возможных путях распространения инфекции в организме млекопитающих.

Анализ клеточного состава селезеночных гранул мышей подтвердил ключевую роль макрофагов в патогенезе туберкулезной инфекции на латентной стадии ее развития. В гранулемах количество дендритных клеток составило примерно 10% относительно макрофагов, тогда как их число в крови животных оценивается не выше 0,1% от мононуклеаров крови [5]. Дендритные клетки считаются не только одними из основных антиген-представляющих клеток, способными или стимулировать или супрессировать иммунный ответ в процессе туберкулезной инфекции, но и главными ее распространителями по организму животных с диссеминацией в различные органы и ткани [12]. Факторы, определяющие участие дендритных клеток в гранулемах мышей в процессе развития туберкулезной инфекции, еще необходимо исследовать.

В составе гранул также идентифицированы фибробласты, нейтрофилы и эозинофилы, лимфоциты разного размера, клетки Пирогова–Лангханса, мегакарициты с тромбоцитами. От-

сутствие отличий 1-Гран и 2-Гран мышей по клеточному составу позволяет предположить, что хотя он и изменялся между гранулемами, в целом был достаточно стабилен и, вероятно, сформировался в организме животных еще при становлении латентной туберкулезной инфекции. Поскольку только макрофаги, дендритные клетки и многоядерные клетки Пирогова–Лангханса гранулам содержали BCG-микобактерии, роль гранулемных клеток других типов в защите мышей от туберкулезной инфекции еще предстоит установить.

Как известно [4, 14], инфицирование микобактериями клеток различных линий мыши и человека в культуре *in vitro* приводит к быстрой элиминации аттенуированных BCG-микобактерий, но не вирулентных *M. tuberculosis* и *M. bovis*, как в фаголизосомах, так и путем апоптозной гибели BCG-зараженных клеток. Однако мы не выявили ни макрофагов, ни дендритных клеток как с BCG-микобактериями, так и без бацилл с характерной проапоптозной морфологией клеток в гранулемах всех мышей на латентной стадии туберкулезной инфекции. Различие гранул мышей по количеству клеток с BCG-микобактериями в гранулемах и по числу гранул с BCG-содержавшими клетками предполагает повышенную чувствительность некоторых животных к развитию туберкулезной инфекции, например, мыши 3 (1-Гран) и 23 (2-Гран). Другие животные, наоборот, были способны сдерживать инфекцию. Факторы, а также межклеточные и внутриклеточные взаимодействия в организме-хозяине, определяющие разную чувствительность мышей одной линии Balb/c к развитию BCG-туберкулезной инфекции, еще предстоит исследовать.

Таким образом, полученная *ex vivo* модель монослойных культур гранулемных клеток позволила оценить вклад клеток разного типа в развитие иммунного ответа при латентной туберкулезной инфекции мышей, а также количество и типы клеток с BCG-микобактериями в гранулемах. Предложенная модель для анализа клеток гранул в культуре *ex vivo* может быть использована для дальнейшего изучения механизмов взаимоотношения внутриклеточных патогенов с клетками-хозяевами и, соответственно, в поиске и развитии новых путей и методов диагностики, лечения и профилактики туберкулеза на разных стадиях заболевания.

Благодарность

Благодарим сотрудников ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН к.б.н. С.И. Байбородина и Т.Е. Алешину за помощь в работе.

Список литературы

1. Апт А.С., Кондратьева Т.К. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина // Молекулярная биология. — 2008. — Т. 42, № 5. — С. 880–890.

Ссылки 2–14 см. в References (с. 234). See References for numbers 2–14 at p. 234.

THE CELLS WITH MYCOBACTERIA IN GRANULOMATOUS AGGREGATES FROM MICE WITH LATENT TUBERCULOUS INFECTION IN *EX VIVO* CULTURE

Ufimtseva E.G.

The Institute of Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to obtain *ex vivo* monolayer culture cells migrated from individual granulomas isolated from the spleens of the Balb/c line mice through 1–2 months after BCG vaccine infection. The second goal was to evaluate influence of different types of cells in the development of granulomatic inflammation and analysis of BCG bacteria content in these cells in the latent stage of tuberculosis. Granulomas were presented by macrophages in general. The number of granulomas was varied as in one mouse as between mice. Granulomas contained also dendritic cells (in average 10% from macrophages of granulomas) and lymphocytes. In some granulomas fibroblasts, neutrophils, eosinophils, multinuclear cells of Pirogov–Langhans, megacariocytes and platelets were observed in all stages of infection. The number of these cells was also varied between granulomas. The acid staining BCG bacteria were only detected in macrophages, dendritic cells and Pirogov–Langhans cells of mice granulomas. Mice were different as by number of cells with BCG bacteria in granulomas as by number of granulomas with BCG-containing cells. The proposed model of granuloma cells of mice in *ex vivo* culture can be used to study interaction between host cells and mycobacteria to find new ways and methods of influence to intracellular pathogens in latent stage of tuberculosis.

Key words: latent tuberculosis, *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine, BCG mycobacteria, granuloma, macrophages, dendritic cells, Langhans giant cells.

Author:

Ufimtseva E.G. ✉, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Cell-Cell Interactions, Institute of Biochemistry, RAMS, Siberian Branch, Novosibirsk. 630117, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2, Institute of Biochemistry of the Siberian Branch of the RAMS. Phone: (913) 480–62-11. E-mail: ufim1@ngs.ru.

References

1. Apt A.S., Kondrat'eva T.K. Tuberkulez: patogenez, immunnyy otvet i genetika khozyaina [Tuberculosis: pathogenesis, immune response and host genetics]. *Molekulyarnaya biologiya — Molecular Biology*, 2008, vol. 42, no. 5, pp. 880–890.
2. Egen J.G., Rothfuchs A.G., Feng C.G., Winter N., Sher A., Germain R.N. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity*, 2008, vol. 28, no. 2, pp. 271–284.
3. Flynn J.L., Chan J., Lin P.L. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol.*, 2011, vol. 4, no. 3, pp. 271–278.
4. Gutierrez M.G., Master S.S., Singh S.B., Taylor G.A., Colombo M.I., Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, 2004, vol. 119, no. 6, pp. 753–766.
5. Hart D.N.J. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 1997, vol. 90, no. 9, pp. 3245–3287.
6. Hogan L.H., Markofski W., Bock A., Barger B., Morrissey J.D., Sandor M. Mycobacterium bovis BCG-induced granuloma formation depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 4, pp. 2596–2603.
7. Hogan L.H., Macvilay K., Barger B., Co D., Malkovska I., Fennelly G., Sandor M. Mycobacterium bovis strain Calmette-Guérin-induced liver granulomas contain a diverse TCR repertoire, but a monoclonal T cell population is sufficient for protective granuloma formation. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, no. 10, pp. 6367–6375.
8. Karakousis P.C., Yoshimatsu T., Lamichhane G., Woolwine S.C., Nuernberger E.L., Grosset J., Bishai W.R. Dormancy phenotype displayed by extracellular Mycobacterium tuberculosis within artificial granulomas in mice. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 200, no. 5, pp. 645–657.
9. Pieters J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*, 2008, vol. 3, no. 6, pp. 399–407.
10. Puissegur M-P., Botanch C., Duteyrat J-L., Delsol G., Caratero C., Altare F. An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacterial and human host cells. *Cell. Microbiol.*, 2004, vol. 6, no. 3, pp. 423–433.
11. Sacco R.E., Jensen R.J., Thoen C.O., Sandor M., Weinstock J., Lynch R.G., Dailey M.O. Cytokine secretion and adhesion molecule expression by granuloma T lymphocytes in Mycobacterium avium infection. *Am. J. Pathol.*, 1996, vol. 148, no. 6, pp. 1935–1948.
12. Schreiber H.A., Sandor M. The role of dendritic cells in mycobacterium-induced granulomas. *Immunol. Lett.*, 2010, vol. 130, no. 1, pp. 26–31.
13. Stewart G.R., Robertson B.D., Young D.B. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, vol. 1, no. 1, pp. 97–105.
14. Van der Wel N., Hava D., Houben D., Fluitsma D., van Zon M., Pierson J., Brenner M., Peters P.J. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, pp. 1287–1298.

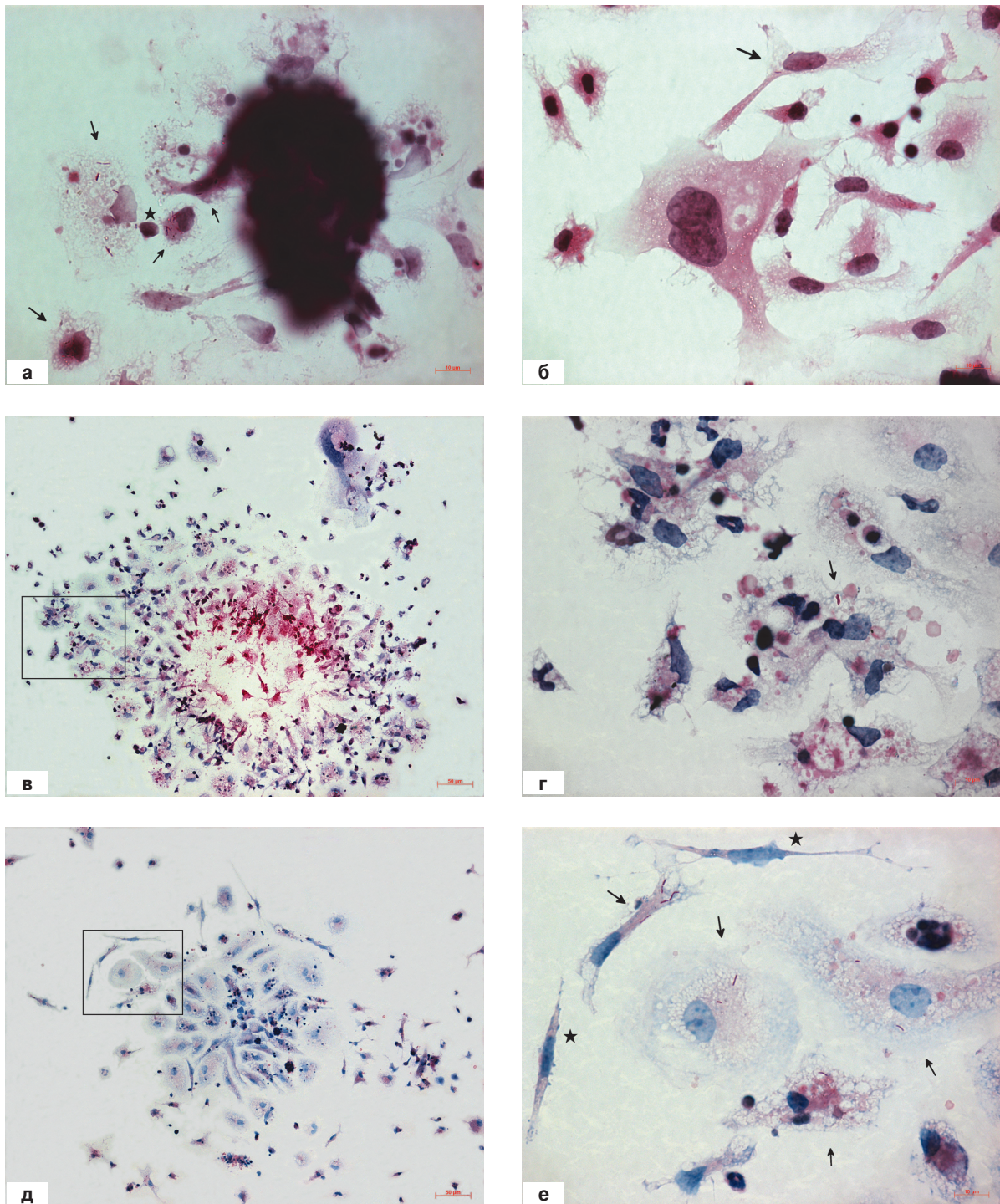


Рисунок 1. Клетки гранул, полученных из селезенок мышей спустя 1 месяц (1-Гран) и 2 месяца (2-Гран) после инфицирования вакциной БЦЖ, в культуре *ex vivo*

Окраска по Цилю–Нильсену. Макрофаги с микобактериями отмечены черными стрелками.

а) Клетки, мигрирующие из гранулемы. На дендритную клетку указывает черная звездочка;

б) Деталь гранулемы с мегакариоцитом в центре;

в) Монослойная культура гранулемы с клеткой Пирогова–Лангханса;

г) Увеличенная деталь гранулемы, отмеченная на в) черной рамкой, с макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами;

д) Монослойная культура клеток гранулемы;

е) Увеличенная деталь гранулемы, заключенная на (д) в черной рамке, с макрофагами, нейтрофилом, лимфоцитами и фибробластами (отмечены черными звездочками).

Масштабная черта 50 мкм (в, д) и 10 мкм (а, б, г, е).