

ВЛИЯНИЕ САПОЗИНА D НА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, А.Э. Эргешов, В.В. Еремеев

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. Протекция при туберкулезной инфекции во многом определяется способностью тканевых макрофагов организма хозяина ограничивать рост и распространение микобактерий. Способные к размножению внутри макрофагов хозяина микобактерии выработали ряд защитных механизмов, препятствующих слиянию фагосом с лизосомами, избегая тем самым разрушительного воздействия лизосомальных ферментов. Сапозины представляют собой небольшие, кислые, термостабильные, не обладающие ферментативной активностью гликолипопротеины, участвующие в качестве кофакторов в процессах деградации гликофинголипидов с короткими олигосахаридными головными группами. Сапозины А, В, С и D образуются в кислых эндосомах в результате расщепления исходной молекулы просапозина. Влияние сапозина D на иммунный ответ человека на микобактериальную инфекцию обусловлено их участием в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1. В предварительных исследованиях методом электронной микроскопии нами было обнаружено повреждающее действие сапозина D на мембрану *Mycobacterium tuberculosis* в кислой среде. Эти данные позволили нам предположить, что сапозин D является важным компонентом защиты от туберкулезной инфекции. Цель исследования — изучение влияния дефицита сапозина D на формирование противотуберкулезного иммунного ответа и на способность макрофагов подавлять рост *M. tuberculosis*. **Материалы и методы.** Работу проводили на интерстициальных легочных макрофагах и макрофагах перитонеального экссудата мышей родительской линии C57BL/6 и дефицитной по гену сапозина D линии C57BL/6-SapD^{-/-}. **Результаты.** В результате проведенных исследований было установлено, что макрофаги мышей линии C57BL/6 дикого типа, как интерстициальные легочные, так и перитонеального экссудата, контролируют рост микобактерий *in vitro* значительно более эффективно, чем макрофаги, дефицитные по гену SAPD. Для изучения возможности компенсации дефицита сапозина D в макрофагах перитонеального экссудата мышей C57BL/6-SapD^{-/-} на основе лентивирусного вектора была создана генетическая конструкция, содержащая искусственный ген сапозина D. Заражение дефицитных по гену SAPD перитонеальных макрофагов экспрессионным вектором приводило к компенсации дефицита сапозина D в этих клетках и восстановлению их бактерицидной функции. Механизм действия всех известных на сегодня лекарств объясняется влиянием на различные пути метаболизма микобактерий (ингибция биосинтеза жирных кислот, арабиногалактана, пептидогликана и биосинтеза белка; ингибция ДНК-зависимых процессов, протонных насосов и цитохром P450-зависимых монооксигеназ). **Выводы.** Показано, что дефицит сапозина D препятствует активации бактерицидной функции макрофагов *in vitro*. Наше исследование

Адрес для переписки:

Шепелькова Галина Сергеевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБНУ Центральный
научно-исследовательский институт туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Contacts:

Galina S. Shepelkova
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza alley, 2,
Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Для цитирования:

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Эргешов А.Э., Еремеев В.В.
Влияние сапозина D на бактериостатическую функцию макрофагов
при экспериментальной туберкулезной инфекции // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 473–480. doi: 10.15789/2220-7619-
TEO-1386

Citation:

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A., Yermeev V.V. Saposin D
acting on macrophage bacteriostatic function in experimental tuberculosis
infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 473–480. doi: 10.15789/2220-7619-
TEO-1386

может являться предпосылкой биологического обоснования возможности использования генетической конструкции на основе гена природного белка человека, а именно сапозина D, в качестве нового противотуберкулезного препарата.

Ключевые слова: туберкулез, макрофаги, сапозин D, искусственный ген, лентивирус, гликолипопротеин.

SAPOSIN D ACTING ON MACROPHAGE BACTERIOSTATIC FUNCTION IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS INFECTION

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Ergeshov A., Yeremeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. The protection against tuberculosis infection is largely determined by the ability of host tissue macrophages to limit the growth and spread of mycobacteria. Able to multiply within the host macrophages, mycobacteria have developed a number of protective mechanisms preventing phagosome-lysosome fusion, thereby evading damaging effects of lysosomal enzymes. Saposins are small, acidic, thermostable, non-enzymatic glycoproteins that participate as co-factors in degradation of short oligosaccharide head group glycosphingolipids. Saposins A, B, C and D are formed in acidic endosomes due to cleavage of initial prosaposin molecule. The effect of saposins on human immune response is mediated by their involvement in presenting mycobacterial antigens on CD1 molecules. Preliminary studies with electron microscopy allowed to uncover saposin D-bound damaging effect on *Mycobacterium tuberculosis* in acidic environment. These data allowed us to suggest that saposin D is an important protective component fighting against TB infection. The aim of the study was to explore how saposin D deficiency might affect formation of anti-tuberculosis immune response and ability of macrophages to inhibit *M. tuberculosis* growth. **Materials and methods.** Interstitial pulmonary macrophages and peritoneal macrophages were isolated from wild type C57BL/6 strain and saposin D deficient C57BL/6-SapD^{-/-} mouse strains. **Results.** It was found that as compared to macrophages from mice, macrophages from wild type strain significantly better controlled mycobacteria growth *in vitro*. To study an opportunity of compensating for deficient saposin D in peritoneal macrophages from C57BL/6-SapD^{-/-} mice, a saposin D gene-bearing lentiviral vector was created. Transfection of SAPD-deficient peritoneal macrophages with expression vector compensated for saposin D deficiency in such cells and restored bactericidal function. The mechanisms of action for current anti-TB drugs are mediated by various metabolic pathways in mycobacteria (inhibited biosynthesis of fatty acids, arabinogalactan, peptidoglycan and protein; inhibition of DNA-dependent processes, proton pumps and cytochrome P450-dependent monooxygenases). **Conclusion.** It was shown that saposin D deficiency affects activation of macrophage bactericidal function *in vitro*. Our study data may be a prerequisite for biologically substantiated potential of using a vector construct bearing natural human protein gene such as saposin D, as a new anti-tuberculosis drug.

Key words: tuberculosis, macrophages, saposin D, artificial gene, lentivirus, glycolipoprotein.

Введение

Защита организма-хозяина от бактериальной инфекции зависит от двух разных типов ответа — врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета [2, 5]. Механизмы, обеспечивающие два этих типа защиты, во многом различны, зависят от активности разных типов клеток и опосредованы разными метаболическими путями. Тем не менее для бактерий с внутриклеточным типом паразитирования все многоступенчатые и разнообразные механизмы защиты и патогенеза сходятся в тканевых макрофагах. Такие клетки, с одной стороны, предоставляют патогену место для выживания и размножения, а с другой стороны, осуществляют эффекторные функции и элиминируют бактерии. Это в полной мере относится к такой инфекции, как туберкулез (ТБ). ТБ до сих пор остается одной из ведущих причин смертности в мире среди инфекционных заболеваний [14]. Факторы, способствующие сдерживанию инфекции или

прогрессированию заболевания, изучены недостаточно, что и диктует необходимость исследования клеточных и молекулярных механизмов реакций иммунного ответа. Макрофаги являются ключевыми участниками этого процесса, поддерживающими баланс в зоне воспаления (гранулемы), которые ингибируют репликацию микобактерий и отвечают за контроль развития патологии.

Сапозины — подгруппа гликопротеинов большого семейства сапозин-подобных белков. Сапозины А, В, С и D образуются в кислых эндосомах путем расщепления просапозина [7]. Сапозины опосредуют взаимодействие между водорастворимым ферментом и связанным с мембраной липидным субстратом либо непосредственно активируют фермент. Показано, что сапозины участвуют в процессе презентации антигенов микобактерий на молекулах CD1 [15]. Продемонстрирована способность сапозина D растворять мембраны, содержащие анионные фосфолипиды [15]. Таким об-

разом, сапозин D является важным компонентом в формировании иммунного ответа к ТБ. Однако неясно, как влияет дефицит этого гликопротеина на формирование противотуберкулезного иммунного ответа, на бактериостатическую функцию макрофагов. Наша работа посвящена изучению влияния сапозина D на способность макрофагов мыши подавлять рост *Mycobacterium tuberculosis in vitro*.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на мышях линий C57BL/6 (B6) и C57BL/6-SapD^{-/-} (SapD-ko), поддерживаемых в питомнике ФГБНУ ЦНИИТ в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. Мыши SapD^{-/-} были любезно предоставлены S.H. Kaufmann (Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany) с разрешения Matsuda J. (The Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan) [11]. В работе использовали 10 поколение гибридов возвратного скрещивания мышей линии SapD^{-/-} на основе C57BL/6 (SapD-ko). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с нормами, принятыми в ФГБНУ ЦНИИТ и одобренными этической комиссией.

Микобактериальные культуры. В работе использовали *M. tuberculosis* (штамм H37RV) из коллекции ФГБНУ ЦНИИТ. Для постановки экспериментов *in vitro* использовали микобактерии в фазе логарифмического роста [13]. *M. tuberculosis* пассировали в жидкой среде Дюбо (Difco), содержащей 0,5% БСА (Sigma, США), 2 цикла по 7 дней, переводили культуральную среду для эукариотических клеток и пропускали через фильтр с диаметром пор 5 мкм. Концентрацию микобактерий в полученном фильтрате определяли на третьи сутки путем подсчета микроколоний H37RV в серийных разведениях фильтрата на агаре Дюбо. В течение этого времени исходную суспензию (взвесь) микобактерий хранили при +4°C [10].

Получение суспензии макрофагов. Методики выделения макрофагов отработаны в нашем институте и подробно описаны [3, 10]. Для получения перитонеальных макрофагов клетки перитонеального экссудата выделяли из брюшной полости мышей через 5 дней после внутрибрюшинной инъекции раствора 3%-ного пептона. Обогащение макрофагальных клеток осуществляли адгезией макрофагов на чашках Петри для эукариотических культур клеток. Макрофаги переводили из монослоя в суспензию раствором Версена.

Для выделения интерстициальных легочных макрофагов гомогенат клеток легочной ткани мышей готовили, используя способы, описан-

ные ранее [8]. Гомогенат инкубировали при 37°C в течение 90 мин с 200 ед/мл коллагеназы/мл и 50 ед/мл ДНКазы I (Sigma, США). После инкубирования клетки легкого дважды промывали солевым раствором Хэнкса (HBSS), содержащим 2% FCS и антибиотики. Затем клетки (от 20×10^6 до 30×10^6) инкубировали в 10 мл среды RPMI, содержащей 10% FCS, в течение 1,5 ч в чашках Петри диаметром 100 мм (Costar-Corning, Badhoevedorp, Нидерланды) при 37°C. Неадгезивные клетки удаляли промыванием, а прилипшие клетки отделяли от пластика путем инкубации монослоев в 0,02%-ном растворе без антибиотиков EDTA-PBS в течение 30 мин при 37°C.

Жизнеспособность перитонеальных и легочных макрофагов оценивали по окраске трипановым синим, и, как правило, она составляла более 93%, а содержание неспецифических эстераз-положительных клеток — более 85%.

Жизнеспособность микобактерий в смешанных культурах определяли по избирательному включению 5,6-³H]-урацила [10].

Продукцию ·NO макрофагами (бактериостатическую активность макрофагов) оценивали в супернатантах смешанных культур по концентрации одного из химически стабильных метаболитов азота — нитрит-аниона (NO₂)⁻, с помощью цветной реакции с реактивом Грисса.

Результаты

Для демонстрации влияния дефицита сапозина D на выживание микобактерий в макрофагах интерстициальные легочные макрофаги мышей B6 и SapD-ko культивировали совместно с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37RV в соотношении «микобактерия—макрофаг» от 1,25:1 до 5:1. Через 72 часа после начала культивирования оценивали жизнеспособность микобактерий в культурах по избирательному включению последними 5,6-³H]-урацила (рис. 1). Как видно на рисунке, макрофаги мышей дикого типа значительно более эффективно контролировали рост *M. tuberculosis*, чем макрофаги мышей, дефицитных по гену SAPD. Особенно четко эти отличия были видны при соотношении в культуре микобактерия: макрофаг 5:1 (рис. 1).

Аналогичные результаты были получены при сокультивировании *in vitro* макрофагов перитонеального экссудата мышей линий B6 и SapD-ko совместно с *M. tuberculosis* при соотношении «бактерия—макрофаг» 5:1 (рис. 2). В данных культурах через 72 часа после начала культивирования оценивали продукцию ·NO макрофагами и жизнеспособность микобактерий.

Активные формы азота (·NO, NO₂, HNO₂) — одни из важнейших эффекторных молекул,

участвующих в антимикобактериальном действии макрофагов. Их продукция макрофагами в значительной степени стимулируется $IFN\gamma$ [4, 9]. В связи с этим представляло интерес исследовать уровень продукции метаболитов азота макрофагами, полученными от мышей дикого типа, и нокаутов по сапозину D. Перитонеальные макрофаги мышей B6 и SapD-ko характеризовались схожей незначительной спонтанной секрецией нитрит-аниона, которая не изменялась при добавлении в культуру микобактерий ($1,8 \pm 0,4 \mu M$ и $1,3 \pm 0,2 \mu M$ соответственно). $IFN\gamma$ в высокой дозе (100 ед/мл) оказывал стимулирующее действие на продукцию нитрит-аниона макрофагами, причем в случае макрофагов, полученных от мышей дикого типа, продукция $\cdot NO$ была достоверно выше (рис. 2А).

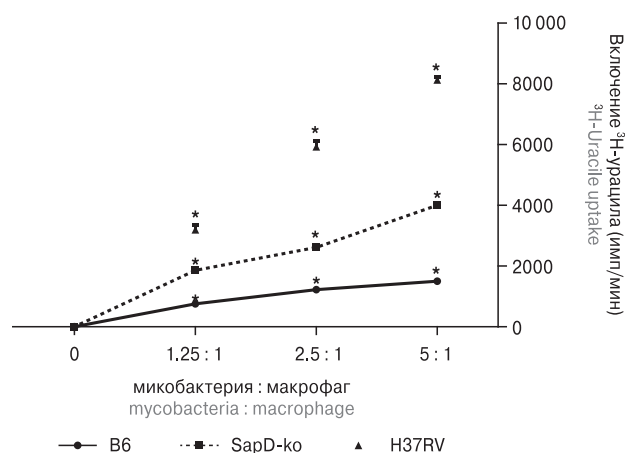


Рисунок 1. Легочные интерстициальные макрофаги мышей SapD-ko значительно уступают макрофагам мышей дикого типа (B6) в способности контролировать рост *M. tuberculosis* при заражении *in vitro* при разных соотношениях «микобактерия–макрофаг» в культуре

Figure 1. Lung interstitial macrophages of SapD-ko mice have significantly lower ability to control the growth of *M. tuberculosis* during *in vitro* infection at different ratios of “microbacteria–macrophage” in culture

Примечания. Макрофаги культивировали в присутствии микобактерий. Через 72 часа в культурах оценивали включение 5,6- $[^3H]$ -урацила. Уровень включения радиоактивной метки служил индикатором метаболической активности микобактерий. На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов ($M \pm SD$, $n = 3$ в группе). * — достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Notes. Macrophages were cultured with mycobacteria. After 72 hours, inclusion of 5,6- $[^3H]$ -uracil was evaluated. The level of 5,6- $[^3H]$ -uracil uptake was used as an indicator of mycobacteria metabolic activity. The data of three independent experiments ($M \pm SD$, $n = 3$ in the group) are presented. * — significant differences between groups ($p < 0.05$).

В тех же культурах оценивали рост микобактерий по избирательному включению последними 5,6- $[^3H]$ -урацила. Было показано, что макрофаги мышей SapD-ko достоверно меньше подавляли рост микобактерий как в присутствии, так и в отсутствии высокой дозы рекомбинантного $IFN\gamma$ (рис. 2Б).

Создание и клонирование искусственного гена сапозина D человека. Для компенсации дефицита сапозина D в макрофагах перитонеального экссудата мышей SapD-ko использовали генетическую конструкцию на основе лентивирусного вектора, содержащую искусственный ген сапозина D. В силу высокой степени гомологии аминокислотной последовательности сапозина D у человека и мыши в работе использовали искусственный ген сапозина D человека.

Для получения искусственного гена сапозина D человека участок гена просапозина, содержащий 5'-нетранслируемую область и сигнальный пептид (205 пар нуклеотидов), получали методом амплификации суммарной человеческой ДНК, выделенной из цельной крови здорового донора. Продукт амплификации (205 пар нуклеотидов) очищали и гидролизовали рестриктазами EcoRI и StuI. Нуклеотидную последовательность, содержащую участок мРНК, кодирующей сапозин D, 3'-нетранслируемую область и сигнал полиаденилирования (1606 пар нуклеотидов), получали методом ПЦР кДНК легочной ткани человека с помощью праймерной пары (sapHincII F: TTATTAGTCGACGGTCA GCCCTGAGCTGGTGTGCAGCATsapDr: ATTA TTGAATTCTAACATTAGGCCAGATCTGGCT AACAGAATTTTATTGTAAATCACAGA).

Продукт, полученный в результате амплификации (1606 пар нуклеотидов), гидролизовали рестриктазами EcoRI и HincII. Затем участки искусственного гена сапозина D человека (фрагменты ДНК размером 205 пар нуклеотидов и 1606 пар нуклеотидов) лигировали с модифицированным вектором pLenti6m, гидролизованным рестриктазой EcoRI (рис. 3).

Плазмидную ДНК (состоящую из лентивирусного вектора, содержащего искусственный ген сапозина D человека, плазмиды, кодирующей структурные белки вируса иммунодефицита человека первого типа, и плазмиды, кодирующей G-белок вируса везикулярного стоматита в соотношении 4:3:1 соответственно) инкубировали совместно с реагентом для трансфекции (Turbofect, Thermo Fisher Scientific, США) в бессывороточной среде, затем смесь равномерно наносили на монослой (до 80%) клеток-упаковщиков линии НЕК293 в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки культивировали 24 часа, после чего в течение последующих двух суток отбирали среду с содержащимися в ней

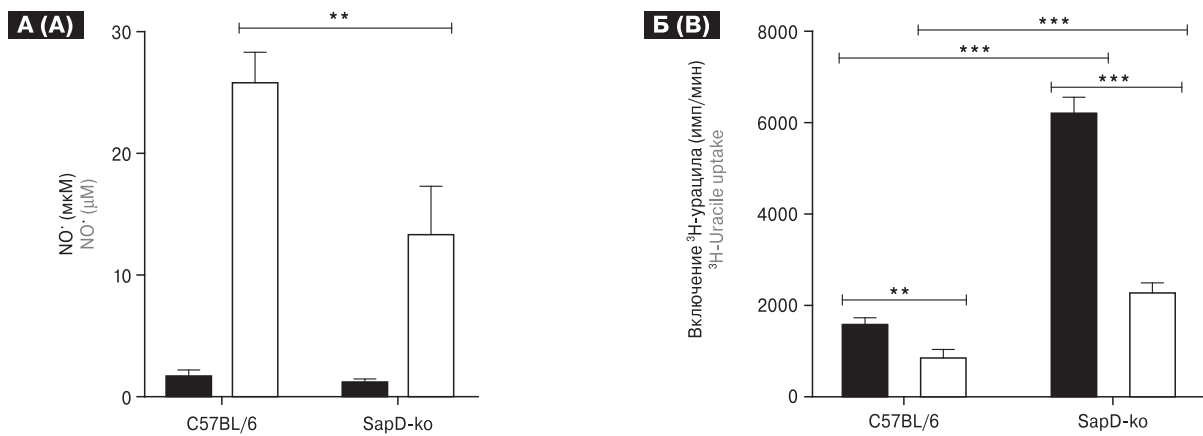


Рисунок 2. Подавление роста микобактерий перитонеальными макрофагами мышей линий В6 и SapD-ko

Figure 2. Mycobacteria's growth inhibition by B6 and SapD-ko peritoneal macrophages

Примечания. Макрофаги перитонеального экссудата культивировали в присутствии микобактерий (■), а также микобактерий и IFN γ (□). Через 72 часа в культурах оценивали количества (NO₂)⁻ (А) и включение ³H-урацила (Б). Включение 5,6-[³H]-урацила микобактериями в отсутствие макрофагов [(5Rv) 7850±180 имп./мин]. На рисунке представлены данные трех независимых экспериментов (M±SD, n = 3 в группе).

Notes. Peritoneal macrophages were cultured with mycobacteria only (■) or with mycobacteria and IFN γ (□). After 72 h of incubation (NO₂)⁻ (A) and ³H-Uracil uptake was quantified (B). 5,6-[³H]-Uracil uptake by mycobacteria without macrophages [(5Rv) 7850±180 cpm]. The data of three independent experiments (M±SD, n = 3 in the group) are presented.

вирусными частицами с интервалом в 12 часов. В качестве положительного контроля трансфекции использовали плазмиду pLenti6m, содержащую GFP. Среду, содержащую вирусные частицы, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Далее фильтрат концентрировали ультрацентрифугированием для использова-

ния в эксперименте *in vitro*. Вирус-содержащий сконцентрированный супернатант клеток-упаковщиков оттитровывали на эмбриональных фибробластах от SapD-ko мышей. Экспрессию сапозина D оценивали путем внутриклеточного окрашивания моноклональными антителами с последующим анализом на проточном ци-

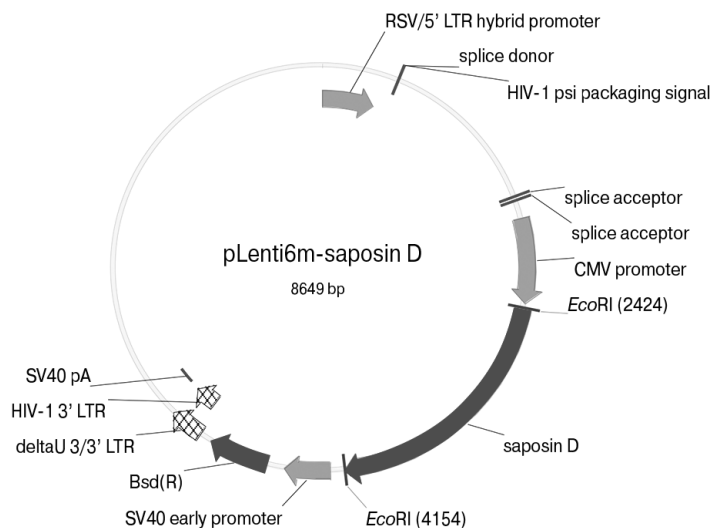


Рисунок 3. Схема лентивирусного вектора pLenti6m saposinD

Figure 3. The lentiviral vector pLenti6m saposinD scheme

RSV/5' LTR hybrid promoter — эукариотический гибридный промотор вируса саркомы Рауса и длинного концевой повтора ВИЧ (вируса иммунодефицита человека); splice donor — донор сплайсинга; splice acceptor — акцептор сплайсинга; HIV-1 psi packaging signal — ψ сигнал упаковки; CMV promoter — цитомегаловирусный промотор; EcoRI — сайт узнавания рестриктазой EcoRI; saposin D — искусственный ген сапозина D человека; SV40 early promoter — ранний промотор SV40; Bsd (R) — ген устойчивости к бластицидину; deltaU 3'/3' LTR — место делеции 3'-области длинного концевой повтора; HIV-1 3' LTR — 3' длинный концевой повтор ВИЧ-1; SV40 pA — сигнал полиаденилирования вируса SV40.

тофлуориметре. Рабочее разведение сконцентрированного раствора вирусных частиц с искусственным геном сапозина D человека определяли титрованием.

Макрофаги перитонеального экссудата мышей SapD-ko инфицировали различными разведениями сконцентрированного раствора вирусных частиц с искусственным геном сапозина D человека (рис. 4). После инфицирования макрофаги культивировали *in vitro* 7 дней, затем промывали средой RPMI, содержащей 2% FCS, и культивировали в присутствии *M. tuberculosis*. Соотношение «микобактерия–макрофаг» в культурах составляло 5:1. Через 72 часа после начала культивирования клеток оценивали жизнеспособность микобактерий по избирательному включению последними 5,6-³H-урацила и продукцию макрофагами $\cdot\text{NO}$ [3]. В качестве положительного контроля использовали культуры зараженных *M. tuberculosis* макрофагов, к которым добавляли рекомбинантный IFN γ .

Изменение антимикобактериальной активности зараженных макрофагов было зафиксировано при инфицировании культуры клеток различными разведениями сконцентрированного лентивируса (рис. 4). Так, наибольшей бактерицидной активностью, сопоставимой с таковой в макрофагах мышей дикого типа, об-

ладали клетки, с искусственным геном сапозина D человека, инфицированные лентивирусом в десятикратном разведении (рис. 4). Снижение концентрации лентивируса в культуре макрофагов приводило к уменьшению антимикобактериальной активности фагоцитов (рис. 4А, Б).

Обсуждение

Этиологическим фактором туберкулеза является сложно организованный внутриклеточный бактериальный патоген — *M. tuberculosis*, способный длительное время выживать в организме хозяина, модифицируя его протективный иммунный ответ. Успешность этой стратегии подчеркивается тем фактом, что на сегодняшний день около 2 млрд человек на Земле инфицированы микобактериями [14]. В латентном периоде микобактерии длительное время персистируют в дормантном состоянии без видимого вреда для хозяина и без передачи инфекции окружающим. Однако при нарушении равновесия между «паразитом» и иммунной системой хозяина *M. tuberculosis* переходит в метаболически активное состояние, начинает реплицироваться, его численность нарастает до нескольких миллиардов, что приводит к разрушению тканей хозяина и распространению

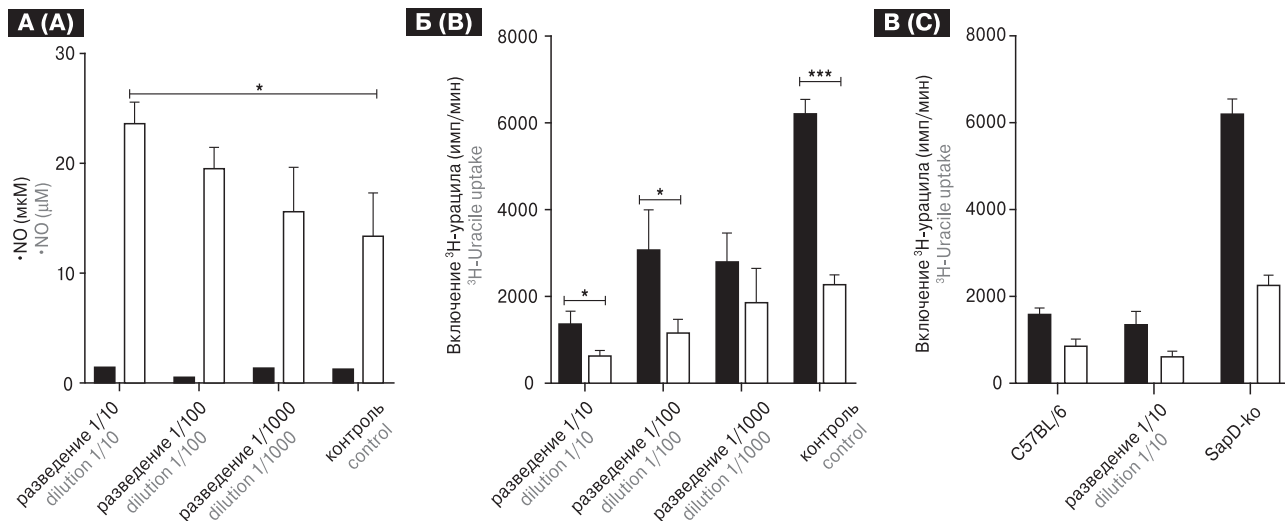


Рисунок 4. Подавление роста *M. tuberculosis* макрофагами перитонеального экссудата, инфицированными сконцентрированными вирусными частицами с искусственным геном сапозина D человека

Figure 4. Mycobacteria's growth inhibition by peritoneal macrophages infected with concentrated viral particles containing artificial human SapD gene

Примечания. Макрофаги перитонеального экссудата мышей линии SapD-ko, инфицированные вирусными частицами с искусственным геном сапозина D человека, культивировали в присутствии микобактерий (■), а также микобактерий и IFN γ (□). Через 72 часа в культурах оценивали количества $(\text{NO}_2)^-$ (А) и включение 5,6-³H-урацила (Б, В). Включение 5,6-³H-урацила микобактериями в отсутствие макрофагов (5Rv) 7850 \pm 180 имп/мин).

Notes. Peritoneal macrophages of SapD-ko mice infected with concentrated viral particles containing artificial human SapD gene were cultured with mycobacteria (■) or mycobacteria and IFN γ (□). After 72 h of incubation $(\text{NO}_2)^-$ (A) and ³H-Uracil uptake was quantified (B, C). 5,6-³H-Uracil uptake by mycobacteria without macrophages (5Rv) 7850 \pm 180 cpm).

инфекции. Глобальный контроль эпидемиологической ситуации по туберкулезу осложняется отсутствием эффективной вакцины [12], распространением лекарственно-устойчивых форм туберкулеза и недостатком быстрых и чувствительных диагностических тестов [16].

Макрофаги организма хозяина захватывают внеклеточный материал, а также освобождаются от использованных компонентов плазматической мембраны в процессе эндоцитоза, при котором образуются короткоживущие органеллы — эндосомы. Из эндосом макромолекулы либо возвращаются обратно в плазматическую мембрану, либо направляются в лизосомы для последующего переваривания и завершения деградации захваченного материала. В кислом содержимом лизосом содержится более 60 различных растворимых гидролитических ферментов, участвующих в переваривании макромолекул. В дополнение к этому лизосомы оснащены белками — активаторами сфинголипидов — сапозинами. Сапозины — кислые, термостабильные, не обладающие ферментативной активностью гликолипопротеины, участвующие в качестве кофакторов в процессах деградации гликосфинголипидов с короткими олигосахаридными головными группами [7]. Основная функция сапозинов — участие в катаболизме сфинголипидов и переваривании мембран, то есть непосредственное участие в киллинге внутриклеточных «паразитов». Механизм действия этих гликолипопротеинов заключается в связывании и активации той или иной гликозидазы, участвующей в деградации соответствующего сфинголипида, а также во взаимодействии с внутрилизосомными мембранами для обеспечения доступности ли-

пида для соответствующих переваривающих ферментов [6]. Таким образом, сапозины — это консервативное оружие, способное бороться непосредственно с микобактериями, что подтверждается и нашими экспериментами *in vitro*. Мы показали, что интерстициальные легочные макрофаги и макрофаги перитонеального экссудата мышей-нокауты по гену сапозина D достоверно слабее подавляли рост *M. tuberculosis*, чем макрофаги мышей дикого типа (рис. 1 и 2). Присутствие в культуре высокой концентрации IFN, активирующего бактерицидную функцию макрофагов, также не нивелирует дефицита сапозина D (рис. 2). Инфицирование макрофагов лентивирусом, содержащим генетическую конструкцию с искусственным геном сапозина D, то есть компенсация дефицита этого гликопротеина, привело к усилению бактериостатической функции последних (рис. 3). Этот эффект может быть связан как со сдвигом метаболизма липидов, так и с бактерицидной функцией самого сапозина (неопубликованные данные). Механизм действия всех известных на сегодня лекарств объясняется влиянием на различные пути метаболизма микобактерий (ингибирование биосинтеза жирных кислот, арабиногалактана, пептидогликана и биосинтеза белка; ингибирование ДНК-зависимых процессов, протонных насосов и цитохром P450-зависимых монооксигеназ). Таким образом, настоящее исследование может являться предпосылкой биологического обоснования возможности использования генетической конструкции на основе гена природного белка человека, а именно сапозина D, в качестве нового средства лечения туберкулеза.

Работа выполнена в рамках темы НИР 0515-2019-0018.

Список литературы/References

1. Еремеев В.В., Апт А.С. Сапозин-подобные белки в противоинфекционном иммунном ответе // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 597–602. [Yeremeev V.V., Apt A.S. Saposin-like proteins in anti-infectious immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 597–602. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-597-602
2. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Апт А.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза в экспериментальных моделях // Туберкулез и болезни легких. 2012. Т. 89, № 7. С. 3–11. [Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Apt A.S. Study of molecular mechanisms of tuberculosis pathogenesis in experimental models. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2012, vol. 89, no. 7, pp. 3–11. (In Russ.)]
3. Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Взаимодействие Т-лимфоцитов CD4⁺CD27^{hi} и CD4⁺CD27^{lo} с макрофагами при туберкулезной инфекции у мышей // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 12. С. 57–60. [Shepelkova G.S., Mayorov K.B., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interaction of T-lymphocytes of CD4⁺CD27^{hi} and CD4⁺CD27^{lo} with macrophages in tuberculous infection in mice. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 12, pp. 57–60. (In Russ.)]
4. Collins H.L., Kaufmann S.H.E. The many faces of host response to tuberculosis. *Immunology*, 2001, vol. 103, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01236.x
5. Hoffman J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5418, pp. 1313–1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313
6. Kishimoto Y., Hiraiwa M., O'Brien J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid Res.*, 1992, vol. 33, no. 9, pp. 1255–1267.
7. Kolter T., Winau F., Schaible U.E., Leippe M., Sandhoff K. Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 50, pp. 41125–41128. doi: 10.1074/jbc.R500015200

8. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yeremeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyper-resistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–5931. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
9. MacMicking, J.D., North R.J., LaCourse R., Mudgett J.S., Shah S.K., Nathan C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, no. 10, pp. 5243–5248. doi: 10.1073/pnas.94.10.5243
10. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent Mycobacterium tuberculosis: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 2, pp. 697–707. doi: 10.1128/iai.71.2.697-707.2003
11. Matsuda J., Kido M., Tadano-Aritomi K., Ishizuka I., Tominaga K., Toida K., Takeda E., Suzuki K., Kuroda Y. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, vol. 13, no. 21, pp. 2709–2723. doi: 10.1093/hmg/ddh281
12. McShane H., Jacobs W.R., Fine P.E., Reed S.G., McMurray D.N., Behr M., Williams A., Orme I.M. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis (Edinb)*, 2012, vol. 92, no. 3, pp. 283–288. doi: 10.1016/j.tube.2011.12.003
13. Nikonenko B.V., Averbakh M.M. Jr., Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–5931. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
14. WHO. Global Tuberculosis report 2019. Geneva: WHO, 2019. URL: https://www.who.int/tb/publications/global_report/ru/ (16.11.2020)
15. Winau F., Schwierzeck V., Hurwitz R., Remmel N., Sieling P.A., Modlin R.L., Porcelli S.A., Brinkmann V., Sugita M., Sandhoff K., Kaufmann S.H., Schaible U.E. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 2, pp. 169–174. doi:10.1038/ni1035
16. Young D.B., Perkins M.D., Duncan K., Barry C.E. 3rd. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, 2008, vol. 118, no. 4, pp. 1255–1265. doi: 10.1172/JCI34614

Авторы:

Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Эргешов А.Э., д.м.н., профессор, директор ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Еремеев В.В., д.м.н., зам. директора по научной работе ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Ergeshov A.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Deputy Director of the Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 20.02.2020
Accepted 11.03.2020