

# Ανοσοπαθγένεια της φυματίωσης

## Μ.Τουμπής

Ο ανθρώπινος οργανισμός είναι εκτεθειμένος σε πληθώρα παθογόνων μικροοργανισμών. Η εκλεκτική επιλογή χιλιάδων ετών οδήγησε στην ανάπτυξη ανοσολογικού συστήματος, που είναι ικανό να εξαλείψει σχεδόν όλα στα εισερχόμενα στον οργανισμό βακτήρια, παράσιτα και ιούς. Παρά ταύτα, υπάρχουν ορισμένα είδη, όπως τα μυκοβακτηρίδια, που έχουν την ικανότητα να παρακάμπτουν το ανοσολογικό σύστημα και να προκαλούν νόσηση και πιθανό το θάνατό. Ένα εξ αυτών είναι το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, που ενοχοποιείται για τη μέχρι τώρα μόλυνση δύο δισεκατομμυρίων, τη νόσηση εννέα περίπου εκατομμυρίων και το θάνατο δύο περίπου εκατομμυρίων ατόμων ετησίως<sup>1</sup>.

Η φυματίωση μεταδίδεται αερογενώς από άτομο σε άτομο. Ελάχιστος αριθμός μυκοβακτηριδίων που φθάνει στις κυψελίδες είναι ικανός να πυροδοτήσει μηχανισμούς άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού. Στα περισσότερα άτομα η τοπική σύμφυτη ανοσία, που αφορά κατά κύριο στα μακροφάγα, επιτυγχάνει να εξαλείψει παντελώς τα βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια. Σε ένα μικρό αλλά σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων επαφής με τα μυκοβακτηρίδια, η σύμφυτη άμυνα αποτυγχάνει να τα ελέγξει. Το συσσωρευμένο μεγάλο μυκοβακτηριδιακό αντιγονικό φορτίο εκτειθέμενο στο ανοσολογικό σύστημα οδηγεί στην ανάπτυξη επίκτητης ανοσίας. Η τελευταία, που ενορχηστρώνεται κυρίως από τα T λεμφοκύτταρα, ελέγχει αλλά δεν εξαλείφει τη μόλυνση. Έτσι μια συνεχόμενη προστατευτική ανοσία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των επίμονων μυκοβακτηριδίων, που όπως προαναφέρθηκε είναι παρόντα στο ένα τρίτο περίπου της ανθρωπότητας<sup>2</sup>.

Η αλληλεπίδραση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων με τα μολυσμένα μακροφάγα παίζει κίριο ρόλο στην επίκτητη ανοσία κατά του μυκοβακτηριδίου. Αναμφίβολα τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα παίζουν το κεντρικότερο και ουσιαστικότερο ρόλο στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου. Σε αυτή φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο και άλλοι υποπληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων, όπως είναι τα CD8+, τα γδTCR+, και τα CD1 οριζόμενα T-λεμφοκύτταρα. Οι μηχανισμοί συμβολής όλων αυτών των κυττάρων στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου ερευνώνται επισταμένα. Από το σύνολο των κυτταροκινών που παράγονται από αυτά ο TNF-α, η IL-12 και η IFN-γ παίζουν κεντρικό ρόλο, τόσο κατά τη ρυθμιστική όσο και κατά την ενεργητική φάση της ανοσολογικής αντίδρασης κατά του μυκοβακτηριδίου<sup>3</sup>.

Από την άλλη το μυκοβακτηρίδιο χρησιμοποιεί σειρά μηχανισμών που αντιστρατεύονται τις αμυντικές δυνάμεις του ξενιστή και στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η τροποποίηση των φαγοσωμάτων, η ουδετεροποίηση των δραστικών μορίων του μακροφάγου, η πρόκληση έκκρισης κατασταλτικών κυτταροκινών και η παρέμβαση στην αντιγονοπαρουσίαση προς τα T λεμφοκύτταρα<sup>3</sup>.

Η σχετική σημασία τόσο των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή όσο και των μηχανισμών διαφυγής του μυκοβακτηριδίου πιθανό να εξαρτώνται από τη φάση της μόλυνσης. Μετά τη αρχική σύμφυτη ανοσιακή απάντηση, αναπτύσσεται η επίκτητη ανοσία προκειμένου ελέγξει τα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια. Ακολουθεί μια χρόνια μνημονική ανοσιακή φάση που είναι απαραίτητη για τον έλεγχο και επιτήρηση των επίμονων μυκοβακτηριδίων αποτρέποντας μια πιθανή επαναμόλυνση. Τελικά η

ισορροπία της αλληλεπίδρασης του μυκοβακτηριδίου και του ανθρώπινου οργανισμού καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των T-λεμφοκυττάρων με τα μολυσμένα μακροφάγα. Η αποτυχία κατά την οξεία ή χρόνια επίκτητη ανοσιακή απάντηση έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη κλινικής νόσου<sup>3</sup>.

Η ανοσοπαθγένεια της φυματίωσης παρουσιάζει σημαντική πολυπλοκότητα και ιδιαίτερες δυσκολίες για την επακριβή διεκρίνισή της. Γι αυτό επιστρατεύονται σχετικά δεδομένα που αφορούν όχι μόνο στον άνθρωπο αλλά και σε μια πλειάδα πειραματόζων. Κατά τη παρούσα βραχεία αναφορά θα παρατεθούν τα νεώτερα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με τους ανοσοπαθογενετικούς μηχανισμούς της φυματίωσης.

## **Σύμφυτη ανοσία**

### ***Είσοδος – εγκατάσταση μυκοβακτηριδίου***

Η φυματίωση μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο, κατά κύριο λόγο αερογενώς. Πηγή μόλυνσης είναι μόνο οι πάσχοντες από φυματίωση του αναπνευστικού. Φορείς της μετάδοσης είναι τα προερχόμενα από το αναπνευστικό σύστημα μικροσταγονίδια που περιέχουν μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης. Τα μολυσματικά σταγονίδια του αναπνευστικού παράγονται όταν άτομα που πάσχουν από πνευμονική φυματίωση βήχουν, φταρνίζονται, τραγουδούν ή και ομιλούν. Από τα ίδια άτομα μπορούν να παραχθούν μολυσματικά σταγονίδια κατά τις διαδικασίες θεραπείας με εισπνεόμενα φάρμακα, πρόκλησης πτυέλων και βρογχοσκόπησης. Επίσης μικρές πιθανότητες δημιουργίας τους υπάρχουν σε εργαστήρια όπου γίνεται επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων.

Τα παραγόμενα από το αναπνευστικό μεγάλα σταγονίδια (με διάμετρο > 5μ) αιωρούνται ελάχιστα στο περιβάλλοντα χώρο και πέφτουν σχεδόν αμέσως στο δάπεδο. Εάν εισπνευσθούν κατακρατούνται λόγω μεγέθους στις ανώτερες αναπνευστικές οδούς, από όπου αποβάλλονται με την βοήθεια του βλεννοκροσσώτου μηχανισμού. Τα μικρά σταγονίδια, διαμέτρου 1-5μ και περιέχοντα 1-2 μυκοβακτηρίδια, αιωρούνται επί πολύ στο περιβάλλον. Αυτά τα μικρά σταγονίδια εισπνεόμενα μπορούν να φθάσουν μέχρι τις κυψελίδες<sup>4</sup>.

Η παθγένεια της φυματίωσης αρχίζει με την εγκατάσταση των μυκοβακτηριδίων στις κυψελίδες. Η κατανομή των εισπνεόμενων μολυσματικών μικροσταγονιδίων καθορίζεται από το πρότυπο του αερισμού των πνευμόνων. Έτσι συχνότερα εντοπίζονται στις μέσες και κατώτερες πνευμονικές ζώνες, χωρίς να αποκλείεται η εντόπιση τους και στις υπόλοιπες ζώνες. Τα παρόντα κυψελιδικά μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν τα μυκοβακτηρίδια. Κατά την πρώτη αυτή φάση, οι σύμφυτοι αμυντικοί μηχανισμοί των μακροφάγων φαίνεται να παίζουν σπουδαίο ρόλο και να καθορίζουν σημαντικά την περαιτέρω παθογενετική εξέλιξη. Την θέση αυτή ενισχύουν πάμπολλα πειραματικά, κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα.

Επτά μέρες μετά την πρωτομόλυνση των πειραματοζώνων του Lurie, ο αριθμός των μυκοβακτηριδίων στους πνεύμονες των ανθεκτικών κουνελιών είναι 20-30 φορές μικρότερος από ότι στους πνεύμονες των ευαίσθητων κουνελιών<sup>5</sup>. Η διαφορά αυτή υπέρ των ανθεκτικών κουνελιών αποδίδεται στη σύμφυτη και όχι στην επίκτητη ανοσία που εξαρτάται από τα T λεμφοκύτταρα.

Έχει προ πολλού αναγνωρισθεί ότι ορισμένοι πληθυσμοί ανθρώπων είναι ιδιαίτερα

ευαίσθητοι στη φυματίωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα υπήρξαν οι Εσκιμώοι της Β.Αμερικής, οι Ινδιάνοι Yanomami, οι αυτόχθονες του Αμαζόνιου και οι μαύροι της Αφρικής και των ΗΠΑ. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση ότι η φυματίωση πρωτοεμφανίστηκε στην Δ. Ευρώπη, όπου με τη πάροδο των ετών ενισχύθηκαν οι μηχανισμοί της σύμφυτης ανοσίας έναντι του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Κατά την εποχή της εξερεύνησης και αποικιοκρατίας η μετακίνηση των Ευρωπαίων προς την ανατολή, δύση και νότο εισήγαγε τη φυματίωση σε πληθυσμούς που δεν διέθεταν ισχυρή σύμφυτη ανοσία έναντι της νόσου με αποτέλεσμα την ύψιστη νοσηρότητα και θνητότητα<sup>6</sup>.

Στις αναπτυγμένες χώρες η επίπτωση της φυματίωσης παρουσιάζει σαφή φυλετική διαφοροποίηση που δεν μπορεί να αποδοθεί σε οικονομικούς ή κοινωνικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, σε έρευνα που έγινε σε οίκους ευγηρίας των ΗΠΑ και αφορούσε 25000 άτομα που εκτέθηκαν ισότιμα σε ενεργό φυματίωση, η συχνότητα μετατροπής της δερμοαντίδρασης φυματίνης ήταν διπλάσια στους μαύρους από ότι στους λευκούς<sup>7</sup>. Προφανώς, κατά το πρώιμο αυτό στάδιο, οι σύμφυτοι μηχανισμοί άμυνας των μαύρων ήταν λιγότερο αποτελεσματικοί από ότι των λευκών. Στην ίδια γραμμή βρίσκεται και η εργαστηριακή παρατήρηση κατά την οποία τα μακροφάγα των Αφρο-Αμερικανών ανέχονται περισσότερο τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό των μολυσματικών μυκοβακτηριδίων<sup>8</sup>.

Από αυτά τα επιδημιολογικά δεδομένα προέκυψε και η υπόθεση της γενετικής βάσης της αντίστασης στη φυματίωση. Σχετικές μελέτες σε ποντίκια ενοχοποίησαν το γονίδιο *ngamp1* που ευθύνεται για τη παραγωγή συγκεκριμένης πρωτεΐνης από τα μακροφάγα και που προσδίδει αντοχή έναντι του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Στον άνθρωπο το ανάλογο γονίδιο ονομάζεται NRMP1. Το πρωτεϊνικό προϊόν αυτού είναι διαμεμβρανικός μεταφορέας σιδήρου των όσμιων ενδοσωμάτων των ηρεμούντων μακροφάγων. Έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι πολυμορφισμοί του NRMP1 σε πληθυσμιακές μελέτες διαφόρων περιοχών του κόσμου, που συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο μετακίνησης της λοίμωξης από τη λανθάνουσα στην ενεργό φάση αυτής<sup>9</sup>. Άλλα γονίδια που πιθανόν να εμπλέκονται στη μειωμένη σύμφυτη ανοσία είναι αυτά των υποδοχέων της βιταμίνης D και του σήματος της IFN-γ.

Έχει παρατηρηθεί ότι η επίκτητη ανοσία που προκαλείται με το εμβόλιο BCG αποτρέπει την εμφάνιση στα πειραματόζωα και στον άνθρωπο των σοβαρών και εκτεταμένων μορφών της νόσου και όχι από την πρωτοπαθή πνευμονική φυματίωση<sup>10,11</sup>. Επιπλέον, η φυσική επίκτητη ανοσία δεν προφυλάσσει από την εξωγενή αναμόλυνση των πνευμόνων. Έτσι, τοπικοί σύμφυτοι αμυντικοί μηχανισμοί που δεν σχετίζονται άμεσα με την επίκτητη ανοσία, εμπλέκονται στην πρόληψη και προστασία έναντι των μυκοβακτηριδιακών πνευμονικών λοιμώξεων.

Τέλος, γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φυματίωσης και του πολυμορφισμού διαφόρων μυκοβακτηριδιακών προϊόντων<sup>12</sup>.

### ***Καθήλωση - Φαγοκυττάρωση***

Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι τα πρωτογενή κύτταρα που εμπλέκονται στην αρχική πρόσληψη των μυκοβακτηριδίων. Στη συνέχεια δένδριτικά κύτταρα και μονοκύτταρα κύτταρα λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της φαγοκυτταρώσεως. Επιπλέον, τα

μυκοβακτηρίδια μπορεί να προσληφθούν και από μη ειδικά φαγοκύτταρα, όπως είναι τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα.

Ένα πρώτο βήμα που προηγείται της φαγοκυτταρώσεως είναι η προσκόλληση των μυκοβακτηριδίων επί των κυψελιδικών τοιχωμάτων και των προαναφερθέντων μακροφάγων. Πιστεύεται ότι η αυξημένη προσκόλληση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης επί των κυττάρων αυτών αντιπροσωπεύει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης φυματίωσης.

Στη διαδικασία της προσκολλησεως φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο διάφορες συλλεκτίνες (collectins) στις οποίες περιλαμβάνονται επιφανειοδραστικές πρωτείνες (Sp), λεκτίνες προσκολλόμενες σε μαννόζη (MBLs) και το C1q του συμπληρώματος. Ποιο συγκεκριμένα η επιφανειοδραστική πρωτείνη A (Sp-A) ευοδώνει την προσκόλληση και πρόσληψη των μυκοβακτηριδίων από τα μακροφάγα, κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και ουδετερόφιλα. Μάλιστα αναφέρεται ότι σε HIV (+) άτομα η συγκέντρωση της Sp-A στους πνεύμονες είναι αυξημένη και συνδυάζεται με τριπλάσια συχνότητα προσκόλλησης των μυκοβακτηριδίων επί των κυψελιδικών μακροφάγων<sup>13</sup>. Αντίθετα, μια άλλη επιφανειοδραστική πρωτείνη, η Sp-D, έχει καταδειχθεί ότι αποκλείει την προσκόλληση και πρόσληψη μολυσματικών μυκοβακτηριδίων<sup>14</sup>.

Η MBL του πλάσματος ευοδώνει τη φαγοκυττάρωση είτε έμμεσα με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος είτε άμεσα μέσω άγνωστων υποδοχέων. Η συγκέντρωση της στο πλάσμα ποικίλη στους διάφορους πληθυσμούς. Τούτο αποδίδεται σε γενετικό πολυμορφισμό του γονιδίου της MBL. Γενικά, ο γενετικός πολυμορφισμός που συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή MBL, φαίνεται να προδιαθέτει σε ανάπτυξη φυματίωσης. Πράγματι σε μια μελέτη αναφέρονται αυξημένες συγκεντρώσεις της MBL σε ασθενείς με ενεργό φυματίωση<sup>15</sup>.

Διάφοροι υποδοχείς της επιφάνειας των μακροφάγων και κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων εμπλέκονται στη διαδικασία προσκόλλησης και της εν συνεχεία ενδοκυτταρώσεως του μυκοβακτηριδίου. Οι σημαντικότεροι εμπλεκόμενοι υποδοχείς των μακροφάγων είναι κυρίως οι του συμπληρώματος 1, 3, 4 (CR1, CR3, CR4) και της μαννόζης (MR). Συμμετοχή φαίνεται να έχουν και οι υποδοχείς σάρωσης (scavenger receptors, ScR), της SP-A, του C τύπου λεκτίνης. Οι υποδοχείς ινονεκτίνης εμπλέκονται στη πρόσληψη του μυκοβακτηριδίου από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι υποδοχείς Fcγ που απαντώνται στην επιφάνεια των μακροφάγων και που διεκολύνουν την φαγοκυττάρωση σωματιδίων επικαλυμμένων με ανοσοσφαιρίνες G, φαίνεται να παίζουν μικρό ρόλο στην φυματίωση<sup>16</sup>.

Τα οψονοποιημένα μυκοβακτηρίδια καθλώνονται και ενδοκυτταρώνονται μέσω των υποδοχέων του συμπληρώματος. Η σημασία αυτών των υποδοχέων καταφαίνεται επί αποκλεισμού αυτών. Για παράδειγμα επί αποκλεισμού του CR1 η φαγοκυττάρωση των μυκοβακτηριδίων μειώνεται κατά 70-80%<sup>17</sup>. Οι υποδοχείς CR3 και CR4 μπορεί να προσλαμβάνουν και μη οψονοποιημένα μυκοβακτηρίδια. Όμως, τα τελευταία καθλώνονται κατά κύριο λόγο στον υποδοχέα MR. Επί αποκλεισμού τόσο των CR όσο και των MR η φαγοκυττάρωση του μυκοβακτηριδίου συνεχίζεται μέσω άλλων υποδοχέων, όπως των ScR-A<sup>16</sup>.

In vitro έχει καταδειχθεί ότι η εμπλοκή διαφόρων υποδοχέων στη πρόσληψη των μυκοβακτηριδίων έχει και διαφορετικές συνέπειες. Για παράδειγμα η συμμετοχή των υποδοχέων CR και MR πυροδοτεί μικρή παραγωγή υπεροξειδίου. Αντίθετα η εμπλοκή των Fcγ στη φαγοκυττάρωση έχει σαν αποτέλεσμα έντονη φλεγμονώδη αντίδραση.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα πολύ λοιμογόνα μυκοβακτηρίδια αποφεύγουν την είσοδο τους στα κύτταρα μέσω των Fcγ υποδοχέων. Οι MR εκφράζονται σε ώριμα μακροφάγα και επιτρέπουν την πρόσληψη λοιμογόνων (H37Rv) και όχι μη λοιμογόνων μυκοβακτηριδίων (H37Ra). Επειδή οι MR υπορυθμίζονται από την IFN-γ, φαίνεται ότι ο ρόλος τους στη πρόσληψη των μυκοβακτηριδίων περιορίζεται στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης και σε άτομα με ανοσοκαταστολή. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των πειραματικών δεδομένων καταδεικνύει ότι ο τύπος του υποδοχέα που εμπλέκεται στην είσοδο του μυκοβακτηριδίου στα κύτταρα μικρό ρόλο παίζει στην ενδοκυττάρια επιβίωσή του<sup>17</sup>. Η in vivo σημασία όλων των ανωτέρω παραμένει ακόμα προς διευκρίνιση.

### ***Αναγνώριση μυκοβακτηριδίου από τα μακροφάγα***

Πέραν της φαγοκυτταρώσεως, η αναγνώριση γενικά των μικροβίων ή των προϊόντων τους αποτελεί κρίσιμο βήμα προς μια αποτελεσματική αντίδραση του ξενιστή. Στη διαδικασία της αναγνώρισης που γίνεται στα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, κείμερο ρόλο παίζουν οι προσομοιάζοντες με διόδια υποδοχείς (Toll-like Receptors, TLR) που ανήκουν στην ομάδα υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs). Πρόκειται για διαμεμβρανικές δομές των οποίων το εξωκυττάριο τμήμα ενώνεται με διάφορα συστατικά ή προϊόντα των μικροβίων, ενώ το κυτταροπλασματικό τους τμήμα σηματοδοτεί την ανοσιακή ενεργοποίηση. Από τους 13 TLR που έχουν περιγραφεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, τρεις μόνο (TLR2, TLR4, TLR9) φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για την αναγνώριση του μυκοβακτηριδίου. Οι TLR2 και TLR4 που βρίσκονται σε συνάφεια με υποδοχείς CD14. Οι TLR2 δεσμεύουν λιποπρωτεΐνες (LM, LpqH), PIMs, STF και λιποαραπινομάνα (LAM). Οι TLR4 δεσμεύουν LAM και HSP65. Οι TLR9 πιθανότατα αναγνωρίζουν τμήματα του μυκοβακτηριδιακού DNA. Η δέσμευση ευοδώνεται και ενισχύεται με την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως είναι η δεσμευόμενη από την βακτηριακή λιποσακχαρίδη (LPS) πρωτεΐνη του πλάσματος και οι διαλυτοί CD14, όταν τα υπεύθυνα κύτταρα στερούνται αυτούς<sup>18,19</sup>.

Μετά τη δέσμευση των προαναφερθέντων συστατικών του μυκοβακτηριδίου πυροδοτούνται διάφορα κανάλια σήματος. Σε αυτά μετέχει η πρωτεΐνη διαφοροποίησης μυελοκυττάρων MyD88 και άλλα εναλλακτικά μόρια όπως IRAK (IL-1 receptor-associated kinases), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), TAK1 (TGFβ-activated protein kinase 1), και MAP (mitogen-activated protein kinase). Τα μεταφερόμενα σήματα ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι ο NF-κB και ο IRF-3 (IFN-regulated factor-3), οι οποίοι με τη σειρά τους σηματοδοτούν την ενεργοποίηση της σύμφυτης ανοσίας και κυρίως τη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF, οι IL1β και IL-12) και NO<sup>16,20,21</sup>. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το ανεξάρτητο από την MyC88 κανάλι ενεργοποίησης σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας. Κατά πόσο η παρατηρούμενη επί λοιμώξεως ανισορροπία μεταξύ κατασταλτικών και μη κυτταροκινών οφείλεται σε πυροδότηση των TLR υποδοχέων από συγκεκριμένα συστατικά του μυκοβακτηριδίου δεν είναι γνωστό. Πάντως, ο ρόλος των TLR και των προσαρμωστικών μορίων στην αναγνώριση του MTB στην και ενεργοποίηση της σύμφυτης ανοσίας φαίνεται και από το γεγονός ότι πειραματόζωα με έλλειψη αυτών παρουσιάζονται ιδιαίτερα ευάλωτα στο MTB<sup>22</sup>.

Πέραν των TLR στην αναγνώριση του MTB εμπλέκονται και άλλοι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι υποδοχείς RIG-like, NOD-like (NLRs), και λεκτίνης C τύπου<sup>23</sup>.

Οι NOD-like υποδοχείς εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Ο τύπος NOD2 αυτών ενώνονται με το μουραμύλ-πεπτίδιο (MDP) της πεπτιδογλυκάνης του MTB. Ζώντα MTB που εντοπίζονται στα φαγοσώματα ενεργοποιούν το κυτταροπλασματικό κανάλι NOD2 προκαλώντας βλάβη στη φαγοσωμική μεμβράνη. Το κανάλι με τη σειρά του εμπλέκεται στη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Πειραματόζωα με έλλειψη των NOD2 παρουσιάζουν ελαττωματική παραγωγή κυτταροκινών και NO όταν προσβληθούν με MTB<sup>23</sup>.

Στην οικογένεια των NLRs συμπεριλαμβάνονται και οι NLRP1, NLRP3 NLRCA (IPAF). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς εμπλέκονται στη δημιουργία διαφόρων τύπων φλεγμονοσωμάτων τα οποία με τρόπο εξαρτώμενο από τη κασπάση-1 προκαλούν την έκκριση IL-1b και IL-18. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα MTB αναστέλλουν αυτού του τύπου την έκκριση των συγκεκριμένων κυτταροκινών. Υπεύθυνο για αυτή την αναστολή είναι το γονίδιο *zmp1* που κωδικοποιεί μια καθαρή μεταλλοπρωτεάση Zn<sup>2+</sup>.

Στην ομάδα των υποδοχέων της λεκτίνης C τύπου ανήκουν οι της μαννόζης που προαναφέρθηκαν και οι ειδικοί για δενδριτικά κύτταρα DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin), οι *dectin-1* και οι *Mincle*. Οι DC-SIGN απαντώνται στα δενδριτικά κύτταρα και δρουν ως υποδοχείς αναγνώρισης και προσκόλλησης μετέχοντας στη μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων και την επαφή τους με τα T κύτταρα. Αναγνωρίζουν τα συστατικά του MTB Man-LAM και LM. Μετά την ένωση με τα μόρια αυτά οι DC-SIGN προάγουν αντιφλεγμονώδη απάντηση μέσω ωρίμανσης των προσβλημένων δενδριτικών κυττάρων και επαγωγή της παραγωγής IL-10. Η αναγνώριση των MTB μέσω των υποδοχέων *dectin-1* προκαλεί την έκφραση γονιδίων για TNF-α, IL-6 και IL-12. Πρόσφατα καταδείχθηκε ότι οι υποδοχείς *Mincle* αναγνωρίζουν το πλέον ανοσοδιεγερτικό συστατικό του MTB, τον TDM (cord factor) τροποποιώντας έτσι την ενεργοποίηση των μακροφάγων<sup>23</sup>.

Για την αναγνώριση λοιπόν του MTB χρησιμοποιούνται ποικίλοι υποδοχείς. Ορισμένοι εντοπίζονται στη κυτταρική ή την φαγοσωμική μεμβράνη (TLR, C-τύπου λεκτίνης) και άλλοι στο κυτταρόπλασμα (NLR). Η συνεργική ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων οδηγεί στη δόμηση αποτελεσματικής ανοσιακής απάντησης.

### ***Δραστικά μόρια κατά του MTB απότοκα της αναγνώρισης του***

Η αναγνώριση των MTB από διάφορους υποδοχείς προκαλεί την έκφραση ποικίλων γονιδίων που επάγουν την άμυνα του ξενιστή. Αναλύσεις της γονιδιακής έκφρασης ποντικών με MTB μόλυνση καταδεικνύουν διάφορα TLR εξαρτώμενα γονίδια. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια *VDR*, *Cyp27b1*, *Slp1*, και *Lcn2*.

Η ενεργοποίηση των TLR υποδοχέων και κυρίως των TLR2, προκαλεί την έκφραση του υποδοχέα της βιταμίνης D (*VDR*) και της υδροξυλάσης *Cyp27b1*. Η τελευταία καταλύει την μετατροπή της προβιταμίνης D σε βιοενεργό βιταμίνη D3. Ερεθισμός των μακροφάγων με βιταμίνη D έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση του πεπτιδίου της καθελιδίνης η οποία ασκεί αντιμυκοβακτηριδιακή δράση<sup>24</sup>.

Η SLP1 είναι εκκριτικός αναστολέας της λευκοκυτταρικής πρωτεάσης και παράγεται από βρογχικά και επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα καθώς και από κυψελιδικά

μακροφάγα κατά τη πρώιμη φάση της μόλυνσης των πνευμόνων με MTB. Τα πειραματόζωα με έλλειψη του χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στα MTB. Ο συγκεκριμένος παράγοντας προκαλεί διάσπαση του τοιχώματος των MTB<sup>25</sup>.

Η Lcn2 γνωστή και ως σιδηροκαλίνη ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών και έχει την ικανότητα να ενώνεται με μικρά υδροφοβικά μόρια, τα σιδηροφόρα. Τα τελευταία είναι βακτηριακά μόρια που δημιουργούνται σε περιβάλλον πτωχό σε σίδηρο και διευκολύνουν την πρόσληψη σιδήρου από αυτά. Η Lcn2 εκκρίνεται στο κυψελιδικό χώρο από τα επιθηλιακά κύτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα κατά τη πρώιμη φάση της MTB μόλυνσης. Ενδοκυτταρώνεται στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, περιορίζοντας έτσι την ανάπτυξη των MTB αφού τους στερεί τον σίδηρο<sup>26</sup>.

Ένα άλλο μόριο που σχετίζεται με το σίδηρο είναι η πρωτεΐνη Nramp1 που κωδικοποιείται από το Slc11a1. Η Nramp1 κατακρατεί δισθενή σίδηρο στο τοίχωμα των φαγοσωμάτων μακράν των MTB, συμβάλλοντας έτσι στο περιορισμό της ανάπτυξής τους. Ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη μυκοβακτηριδιακή μόλυνση δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί<sup>26</sup>.

### ***Αυτοφαγία***

Η αυτοφαγία αρχικά θεωρήθηκε ως μηχανισμός ομοιόστασης με τον οποίο αποδίδονται στα λυσοσώματα κυτταροπλασματικά συστατικά για αποδόμηση. Η διαδικασία αυτή παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης δομικών συστατικών και προμήθειας αμινοξέων σε περιόδους αστίας. Κατά τα τελευταία χρόνια αναγνωρίστηκε ότι ο μηχανισμός της αυτοφαγίας ασκεί ευρύτερη λειτουργία στην οποία περιλαμβάνεται η αντιμικροβιακή δράση και γενικά η ανοσιακή αντίδραση. Έτσι η αυτοφαγία εμπλέκεται στην εξάλειψη ενδοκυττάρων (MTB, Shigella) και εξωκυττάρων παθογόνων που προσβάλλουν την κυτταρική μεμβράνη (*A streptococcus*)<sup>27</sup>.

Στην αυτοφαγία παρατηρούνται τρεις φάσεις ανάπτυξης, η έναρξη, η περιχαράκωση και η ωρίμανση, που έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μεμβρανώδους οργανιδίου, του αυτοφαγοσώματος. Σε αυτό περικλείονται ατελή οργανίδια, μεγάλα μακρομοριακά αθροίσματα, ενδοκυττάρια παθογόνα κλπ. Το αυτοφαγόσωμα στη συνέχεια συγχωνεύονται με λυσοσώματα δημιουργούμενου έτσι του αυτολυσοσώματος. Έχει πλέον καταδειχθεί ότι η αυτοφαγία προάγει τη σύμφυτη ανοσία κατά του MTB επάγοντας την φαγολυσοσωμική ωρίμανση στα μακροφάγα.

Προσαρμοστικό μόριο κλειδί για την έναρξη της αυτοφαγίας είναι η LRG47 (γνωστή ως Irgm1 στα ποντίκια και ως IRGM στον άνθρωπο). Το συγκεκριμένο μόριο ενεργοποιείται από την IFN- $\gamma$  ή μέσω των LTR4 υποδοχέων. Πειραματόζωα με έλλειψη του LRG47 είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στα MTB<sup>27</sup>.

### ***Παραγωγή κυτταροκινών***

Μετά την αναγνώριση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα πυροδοτείται μία φλεγμονώδης αντίδραση, στην οποία διάφορες κυτταροκίνες και χημειοτακτικοί παράγοντες παίζουν καίριο ρόλο. Μέσω του πλέγματος αυτών των παραγόντων επιτυγχάνεται η ρύθμιση και αυτορρύθμιση της όλης αντίδρασης, που αποσκοπεί στην καταστροφή ή περιορισμό του μυκοβακτηριδίου.

### **Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.**

**TNF- $\alpha$**  Ο παράγων νεκρώσεως των όγκων- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) παράγεται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα μετά από ερεθισμό με μυκοβακτηρίδια ή προϊόντα αυτών. Παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, στον σχηματισμό του κοκκιώματος και στη ρύθμιση της όλης ανοσιακής απάντησης. Ανευρίσκεται κυρίως στους τόπους εντόπισης της νόσου. Η συστηματική διασπορά του TNF- $\alpha$  πιθανό να ενοχοποιείται για ανεπιθύμητες φλεγμονώδεις εκδηλώσεις, όπως είναι ο πυρετός και η απώλεια βάρους.

Κατά το πρώιμο στάδιο της θεραπείας, η κλινική επιδείνωση της φυματίωσης συσχετίζεται με αύξηση των επιπέδων του TNF- $\alpha$  στο πλάσμα. Αντίθετα, η γρήγορη βελτίωση της νόσου συσχετίζεται με ταχεία μείωση των επιπέδων του. Τα ποντίκια με αποκλεισμό του TNF- $\alpha$  ή των υποδοχέων TNF- $\alpha$ R p55 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη φυματίωση. Επίσης, στον άνθρωπο η σύγχρονη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων με αντισώματα έναντι του TNF- $\alpha$  συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα φυματίωσης και μάλιστα εκτεταμένων ή και εξωπνευμονικών μορφών αυτής<sup>16,28</sup>.

**IL-1 $\beta$** . Η ιντερλευκίνη-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) παράγεται από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα ως προ-IL-1 $\beta$ . Μετατρέπεται σε IL-1 $\beta$  με τη βοήθεια της κασπάσης-1 που παράγεται μετά από ερεθισμό με MTB ή αναγνώριση προϊόντων του από τους ενδοπλασματικούς υποδοχείς NOD2. Ανευρίσκεται κυρίως στους τόπους εντόπισης της νόσου. Μετά από φυματική μόλυνση ποντικών με αποκλεισμό της IL-1 ή των υποδοχέων IL-1R τύπου 1 παρατηρείται υπέρμετρη ανάπτυξη μυκοβακτηριδίων και ελαττωματικός σχηματισμός φυματώματος. Στον άνθρωπο η αυξημένη συγκέντρωση της IL-1 $\beta$  σε σχέση με αυτή του φυσικού ανταγωνιστή της (IL-1Ra) πιθανό να συνδυάζεται με προστασία έναντι των σοβαρών μορφών της νόσου<sup>16,28</sup>.

**IL-6**. Η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) παράγεται κατά τη πρώιμη φάση της νόσου στο τόπο εντόπισής της και διαθέτει τόσο προφλεγμονώδη όσο και αντιφλεγμονώδη δράση. Αναστέλλει την παραγωγή του TNF- $\alpha$  και της IL-1 $\beta$  και υπό αυτή την έννοια μπορεί να ασκεί βλαπτική επίδραση. Αναφέρεται όμως και επωφελής δράση αυτής στη φυματίωση. Για παράδειγμα, τα ανεπαρκή σε IL-6 ποντίκια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη φυματίωση και αυτό αποδίδεται σε ελλειμματική παραγωγή IFN- $\gamma$  κατά το πρώιμο στάδιο της νόσου<sup>16</sup>.

**IL-12**. Η ιντερλευκίνη-12 είναι ετεροδιμερής αποτελούμενη από δύο υποομάδες, την p40 και p35. Εκκρίνεται από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα. Προάγει την διαφοροποίηση των T κυττάρων σε T βοηθητικά (T-helper 1, Th1) και τη παραγωγή της IFN- $\gamma$  μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων της IL-12R $\beta$ 1 και IL-12R $\beta$ 2. Πρόκειται δηλαδή για ρυθμιστικό παράγοντα που διασυνδέει την σύμφυτη με την επίκτητη ανοσιακή απάντηση έναντι του μυκοβακτηριδίου και που ασκεί την προστατευτική του δράση μέσω της ευόδωσης της παραγωγής της IFN- $\gamma$ . Ανευρίσκεται τόσο αυτή όσο και οι υποδοχείς της στους τόπους εντόπισης της νόσου. Πειραματόζωα με αποκλεισμό της IL-12 παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία έναντι του MTB<sup>16,28</sup>.

**IL-18**. Η ιντερλευκίνη 18 που προσομοιάζει με την IL-1, προάγει κατά κύριο λόγο την παραγωγή IFN- $\gamma$ . Μέσω αυτής της δράσεώς της φαίνεται να ασκεί προστατευτικό ρόλο έναντι της φυματίωσης. Ποντίκια με αποκλεισμό της IL-18 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης και στο BCG. Αντίθετα, ποντίκια με ιδιαίτερη



ανθεκτικότητα έναντι του μυκοβακτηριδίου της λέπρας χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση της IL-18<sup>16,29</sup>.

**IL-15.** Η ιντερλευκίνη (IL-15) που προσομοιάζει με την IL-2 παράγεται κατά κύριο λόγο στα μακροφάγα και μονοκύτταρα. Προάγει και αυτή την παραγωγή της IFN- $\gamma$ . Η αυξημένη έκφραση του mRNA της IL-15 συσχετίζεται περισσότερο με την ανοσολογικά ισχυρή φυματιώδη λέπρωση παρά με την ανοσολογικά ανίσχυρη λεπρωματώδη λέπρωση<sup>16</sup>.

**IFN- $\gamma$ .** Η ιντερφερόνη- $\gamma$  παίζει σπουδαίο προστατευτικό ρόλο στη φυματίωση. Παράγεται κατά αντιγονοεξαρτώμενο τρόπο μέσα στα πλαίσια της ειδικής ανοσίας, αλλά και κατά τρόπο μη ειδικό. Μετά από διέγερση με κεκεθαρμένη φυματίνη (PPD) in vitro τα μη μολυσμένα με μυκοβακτηρίδια άτομα δεν παρουσιάζουν παραγωγή IFN- $\gamma$ . Ομως η μόλυνση με μυκοβακτηρίδιο μονοκύτταρων κυττάρων που προέρχονται από PPD θετικά ή αρνητικά άτομα προκαλεί παραγωγή IFN- $\gamma$  μέσω διέγερσης των T λεμφοκυττάρων.

Η μη ειδική αντιγονο-ανεξάρτητη παραγωγή της IFN- $\gamma$  πιθανό να παρουσιάζεται κατά τα πρώιμα στάδια της νόσου και να απαιτεί την παρουσία διαφόρων παραγόντων, όπως είναι ο TNF- $\alpha$ , η IL-1 $\beta$ , η IL-12 και η IL-18. Τα κύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  κατά μη ειδικό τρόπο είναι τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK), τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα γδ-λεμφοκύτταρα και τα CD1-περιοριζόμενα λεμφοκύτταρα<sup>16,28</sup>.

#### **Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες**

Την προφλεγμονώδη αντίδραση που πυροδοτείται με την αναγνώριση του μυκοβακτηριδίου ανταγωνίζονται διάφοροι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Οι διαλυτοί υποδοχείς του TNF- $\alpha$  τύπου I και II (sTNF- $\alpha$  I/II) και ο ανταγωνιστής των υποδοχέων της IL-1 (IL-1Ra) παρεμποδίζουν την καθήλωση των σχετικών κυτταροκινών, διακόπτοντας έτσι την περαιτέρω διαδικασία δράσης τους. Επιπλέον η IL-4, η IL-10 και ο αυξητικός παράγων μεταμόρφωσης (Transforming Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ίσως αναστέλλουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών.

**IL-10.** Η ιντερλευκίνη 10 παράγεται από τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα.. Σε ασθενείς με φυματίωση το mRNA της IL-10 εκφράζεται σε κυκλοφορούντα μονοκύτταρα, πλευριτικό υγρό και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Αυξημένη παραγωγή της διαπιστώνεται σε φυματικούς ασθενείς με ανεργία Η IL-10 ανταγωνίζεται την προφλεγμονώδη διαδικασία μετριάζοντας την παραγωγή της IFN- $\gamma$ , του TNF- $\alpha$  και της IL-12<sup>16,28</sup>.

**TGF- $\beta$ .** Αυξημένη συγκέντρωση του TGF- $\beta$  ανευρίσκεται στους τόπους των φυματικών βλαβών. Ο TGF- $\beta$  παράγεται από τα μονοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το LAM μολυσματικών μυκοβακτηριδίων προκαλεί εκλεκτική παραγωγή του TGF- $\beta$ . Ανταγωνίζεται την αντιγονο-παρουσίαση, καταστέλλει την εξαρτώμενη από τα T λεμφοκύτταρα ανοσία, αναστέλλει την παραγωγή της IFN- $\gamma$  και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επιπρόσθετα, πιθανό να εμπλεκεται στη διαδικασία της ιστικής καταστροφής και ίνωσης επειδή προάγει την παραγωγή και εναπόθεση κολλαγενασών και θεμέλιας ουσίας κολλαγόνου. Ο TGF- $\beta$  προκαλεί εκλεκτική παραγωγή της IL-10, ενώ και οι δύο κυτταροκίνες ασκούν συνεργική δράση<sup>16,28</sup>.

**IL-4.** Η IL-4 καταστέλλει την παραγωγή IFN- $\gamma$  και την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Η υπερέκφραση αυτής συσχετίζεται με αυξημένη ιστική καταστροφή σε πειραματόζωα

και με την υπάρξη σπηλαιών στον άνθρωπο. Ομως δεν είναι βέβαιο το κατά πόσο είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα αυτών των βλαβών<sup>16,28</sup>.

### ***Χημειοτακτικοί παράγοντες***

Οι χημειοτακτικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την στρατολόγηση και διοχέτευση των φλεγμονωδών κυττάρων στο τόπο της λοίμωξης. Στη φυματίωση, από τους 40 περίπου υπάρχοντες χημειοτακτικούς παράγοντες, τρεις μελετήθηκαν περισσότερο, η IL-8, η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοπύρηνων (MCP-1) και οι RANTES.

Η IL-8 παράγεται από τα μακροφάγα και τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα. Έλκει κατά κύριο λόγο ουδετερόφιλα και ίσως λεμφοκύτταρα. Σε μεγάλο βαθμό η παραγωγή της βρίσκεται υπό τον έλεγχο του TNF-α και IL-1β. Η (MCP-1) παράγεται από τα μονοπύρηννα και μακροφάγα και ασκεί τη δράση της επί αυτών των κυττάρων. Σε πειραματόζωα η απουσία της αναστέλλει τον σχηματισμό κοκκιάματος. Τέλος, οι RANTES παράγονται από διάφορα κύτταρα και ασκούν τη δράση τους μέσω διαφόρων χημειοτακτικών υποδοχέων. Και οι τρεις παράγοντες ανευρίσκονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στο πλάσμα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και στο πλευριτικό υγρό ασθενών με φυματίωση<sup>16,28</sup>.

### **Επίκτητη ανοσία**

#### ***Αντιγονο-παρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα***

Μετά την φαγοκυττάρωση και την αναγνώριση των συστατικών προϊόντων του μυκοβακτηριδίου από τα μονοπύρηννα, μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα, ακολουθεί η παρουσίαση αυτών στα λεμφοκύτταρα κατά διάφορους ειδικούς τρόπους. Τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι τα δένδριτικά και ποιο συγκεκριμένα τα CD11b<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup>. Ο τόπος έναρξης της επίκτητης ανοσίας που χαρακτηρίζεται από την ειδική ευαισθητοποίηση των λεμφοκυττάρων είναι οι επιχώριοι λεμφαδένες. Η IL-12p40 προάγει τόσο τη μετανάστευση των δένδριτικών κυττάρων στους λεμφαδένες όσο και την αντιγονοπαρουσίαση στα λεμφοκύτταρα<sup>30</sup>. Τα τελευταία παίζουν καίριο ρόλο στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου είναι τα CD4. Επιπρόσθετα τα CD8, τα  $\gamma/\delta$  T-λεμφοκύτταρα και τα περιοριζόμενα από το CD1 λεμφοκύτταρα φαίνεται να μετέχουν ενεργά στη διαμόρφωση της άμυνας κατά του μυκοβακτηριδίου<sup>16,30,31</sup>.

Τα CD4 λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν με τον ειδικό  $\alpha/\beta$  υποδοχέα τους μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα τα οποία είναι συνδεδεμένα με μόρια τάξεως II του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) που εντοπίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί αρκετά μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα που αναγνωρίζονται με αυτή τη διαδικασία. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι 30-32 KDa πρωτεΐνες του συμπλέγματος 85, οι 32 και 39 KDa, οι 19 και 38 KDa λιποπρωτεΐνες, το ESAT-6 και το CFP-10<sup>16,30,31</sup>.

Μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα που διαφεύγουν από τα φαγοσώματα διασυνδέονται με μόρια MHC τάξεως I και στη συνέχεια εκφράζονται στην επιφάνεια των μακροφάγων και υπόλοιπων αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τα κυτταροπλασματικά αυτά μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα, που είναι συνδεδεμένα με μόρια MHC τάξεως I αναγνωρίζουν με τους υποδοχείς τους τα CD8 λεμφοκύτταρα<sup>16</sup>.

Τα γδ Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν με τον ειδικό υποδοχέα τους μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα, που φαίνεται να είναι διαφορετικά από αυτά που αναγνωρίζουν τα CD4 και CD8 λεμφοκύτταρα. Οι συνθήκες αναγνώρισης των αντιγόνων και η ενεργοποίησή τους διερευνούνται επισταμένα<sup>30,31</sup>.

Ενας άλλος υποπληθυσμός των Τ λεμφοκυτταρων που μετέχει στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης είναι τα περιοριζόμενα από το CD1 Τ-λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για τον μικρότερο λεμφοκυτταρικό πληθυσμό που αναγνωρίζει κυρίως λιποπρωτεϊνικά αντιγόνα μέσω του ειδικού CD1 αβTCR υποδοχέα τους<sup>16,30,31</sup>.

Γίνεται λοιπόν φανερό ότι στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου μετέχουν διάφοροι υποπληθυσμοί των Τ λεμφοκυττάρων. Διαφοροποιούνται ως προς το είδος και τους μηχανισμούς αναγνώρισης των μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων. Φαίνεται ότι η ποικιλία των μετεχόντων λεμφοκυττάρων αυξάνει τον αριθμό των αναγνωριζόμενων μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων. Επίσης, τα συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα μπορεί να διαφοροποιούνται και ως προς το βαθμό συμμετοχής τους στα διάφορα στάδια της ανοσιακής απάντησης. Εκκρίνουν IFN-γ και TNF-α, μπορούν να λύσουν μολυσμένα κύτταρα και να βοηθήσουν τα μακροφάγα να ελέγξουν τον πολλαπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων.

### ***Ενεργοποίηση Τ λεμφοκυττάρων***

**CD4+ λεμφοκύτταρα.** Από το σύνολο των υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων που μετέχουν στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, τα CD4+ αναμφίβολα παίζουν τον κεντρικότερο και ουσιαστικότερο ρόλο. Γενικά, τα ενεργοποιημένα CD4+ λεμφοκύτταρα ενδυναμώνουν και ενισχύουν την ανοσιακή απάντηση. Παράγουν και εκκρίνουν IFN-γ και TNF α,β δια των οποίων ενεργοποιούν τα μακροφάγα. Επίσης τα ενεργοποιημένα CD4 παρέχουν βοήθεια στα γδ και CD8 λεμφοκύτταρα μέσω της έκκρισης IL-2. Επιπρόσθετα αποκτούν και κυτταροτοξικές ιδιότητες, καταστρέφοντας έτσι τα μολυσμένα με μυκοβακτηρίδια μακροφάγα<sup>14,21,30,31</sup>.

Υπάρχουν πια αρκετά δεδομένα που αφορούν τόσο σε ποντίκια όσο και στον άνθρωπο ότι τα CD4+ με βοηθητικές ικανότητες (T-helper, Th) μπορούν να διακριθούν σε δύο φαινοτυπικές κατηγορίες, τα Th1 και Th2. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα καλούμενα Th0 ή ανενεργά-σιωπηρά (null) κύτταρα, η δε διαφοροποίηση από τα προγονικά τους κύτταρα φαίνεται να είναι υπό τον έλεγχο ιντερλευκινών και ιδιαίτερα της IL-12. Τα Th1 κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητα παραγωγής IFN-γ και IL-2 μετά από αντιγονικό ερεθισμό, ενώ τα Th2 από την ικανότητα παραγωγής IL-4, IL-5 και IL-10. Γενικά, η αντίδραση Th1 συσχετίζεται με την προστατευτική ανοσία, ενώ η Th2 ίσως να συνδέεται με ελλειμματική ανοσία<sup>31</sup>.

Στο περιφερικό αίμα ασθενών με πνευμονική φυματίωση μετά απο αντιγονικό ερεθισμό παρατηρείται κυρίως αντίδραση τύπου Th2. Αντίθετα στο πνευμονικό παρέγχυμα η αντίδραση είναι κυρίως τύπου Th1. Υπάρχει δηλαδή μια διαμερισματοποίηση της ανοσιακής απάντησης, με επικέντρωση και συσσώρευση των αμυντικών δυνάμεων στους τόπους των φυματικών βλαβών.

Υποστηρίζεται ότι η δύναμη της Th1 αντίδρασης συσχετίζεται με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. Για παράδειγμα, χαμηλά επίπεδα IFN-γ στο περιφερικό αίμα και η απουσία Th1 λεμφοκυτταρώσεως στο πνευμονικό παρέγχυμα συνδιάζονται με σοβαρές κλινικές μορφές της φυματίωσης, όπως εκτεταμένη και σπηλαιώσδης νόσος. Αντίθετα, η

παρουσία λεμφοκυτταρώσεως τύπου Th1 στο πνευμονικό παρέγχυμα συσχετίζεται με περιορισμένη και κλινικά ήπια νόσο<sup>16,30,31</sup>.

Τα σχετικά με την έκφραση της Th2 αντίδρασης στη φυματίωση είναι αντικρουόμενα. Αυτό εν πολλοίς αποδίδεται στο ότι ο μικρός αριθμός των Th2 mRNA ανιχνεύεται μόνο με ειδική μέθοδο (RT-PCR), ενώ οι Th2 ιντερλευκίνες είναι βιολογικά δραστικές σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις που δεν ανιχνεύονται με ELISA. Επίσης, στους ανθρώπους η IL-4 που αποτελεί ένα από τους κύριους εκπροσώπους της Th2 αντίδρασης, ανευρίσκεται υπό δύο μορφές, την αληθή IL-4 και την IL-4δ2 ποικιλία αυτής. Με τη χρήση της RT-PCR και της κυτταρομετρίας ροής διατίθενται πλέον στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η έκταση και η σοβαρότητα της νόσου συσχετίζονται με αυξημένη έκφραση της IL-4 και της IL-4δ2<sup>31,32</sup>.

**CD8+ λεμφοκύτταρα.** Τα CD8+ λεμφοκύτταρα αποτελεί τον δεύτερο λεμφοκυτταρικό υποπληθυσμό που μετέχει στην άμυνα κατά του μυκοβακτηριδίου. Όμως η έκταση και ο βαθμός της συμμετοχής τους δεν έχουν ακόμα διευκρινισθεί. Ο λόγος CD4/CD8 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ενεργό φυματίωση αναφέρεται μειωμένος ή ανεπηρέαστος, ενώ η αυξημένη παρουσία CD8+ λεμφοκυττάρων συσχετίζεται με βραδεία βελτίωση της νόσου.

Τα ενεργοποιημένα CD8+ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$ , σε μικρότερες όμως ποσότητες από ότι τα CD4 λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης και IL-4. Επιπλέον μπορεί να καταστούν αφ ενός μεν κυτταροτοξικά για τα μολυσμένα μονοπύρρηνα και μακροφάγα, αφ ετέρου δε άμεσα μικροβιοκτόνα. Η granulysin και η perforin που διαθέτουν και εκκρίνουν είναι σε θέση να θανατώνουν άμεσα τα απελευθερούμενα μυκοβακτηρίδια από τα καταστραμμένα μακροφάγα<sup>16,30</sup>.

**$\gamma\delta$  λεμφοκύτταρα.** Ο ρόλος των  $\gamma\delta$  λεμφοκυττάρων στη φυματίωση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Τα περισσότερα κυκλοφορούντα  $\gamma\delta$  λεμφοκύτταρα εκφράζουν τα V $\delta$ 9 και V $\delta$ 2 στοιχεία στον υποδοχέα τους. Τα μυκοβακτηρίδια είναι σε θέση να ενεργοποιούν τα V $\delta$ 2+ κύτταρα. Όπως και τα ενεργοποιημένα CD4 και CD8 λεμφοκύτταρα, έτσι και τα ενεργοποιημένα  $\gamma\delta$  λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$ , συμβάλλουν στη καταστροφή των μολυσμένων μακροφάγων και στη μείωση της βιωσιμότητας των μυκοβακτηριδίων. Η απουσία των V $\delta$ 9V $\delta$ 2 T λεμφοκυττάρων από τους πνεύμονες ή το περιφερικό αίμα συσχετίζεται με εκεταμένη νόσο<sup>30</sup>.

**CD1-περιοριζόμενα T λεμφοκύτταρα.** Ο ρόλος των CD1-περιοριζόμενων T λεμφοκυττάρων στη φυματίωση παραμένει αδιευκρίνιστος. Πάντως, ενεργοποιούμενα αυτά τα λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$  και καθίστανται κυτταροτοξικά για τα μολυσμένα μακροφάγα<sup>16,30,31</sup>.

Από τα παραπάνω έγινε φανερό ότι ο κύριος αποτελεσματικός μηχανισμός της κυτταρικής ανοσίας κατά της φυματίωσης είναι η ενεργοποίηση των μολυσμένων με μυκοβακτηρίδια μακροφάγων. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με την δράση της IFN- $\gamma$  που παράγεται από τους διάφορους υποπληθυσμούς των T-λεμφοκυττάρων και ιδιαίτερα των CD4+ βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Από την άλλη, η παραγωγή της IFN- $\gamma$  βρίσκεται υπό τον έλεγχο διαφόρων ιντερλευκινών, όπως TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-15 και IL-18, που όλες παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Παρατηρείται δηλαδή μια αλληλοενίσχυση της ενεργοποίησης των μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων που ενδυναμώνει την αποτελεσματικότητα της ανοσιακής αντίδρασης κατά του μυκοβακτηριδίου.

### ***Μηχανισμοί καταστροφής του μυκοβακτηριδίου από το μακροφάγο***

Η ικανότητα των μακροφάγων να αναστέλλουν την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου και να το καταστρέφουν εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησής τους. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των μακροφάγων δεν είναι επακριβώς γνωστοί. Πιθανόν αφορούν τόσο τη σύμφυτη όσο και την επίκτητη ανοσία. Πάντως είναι βέβαιο ότι διάφορες λεμφοκίνες όπως είναι η IFN- $\gamma$  και ο TNF- $\alpha$  μετέχουν στη διαδικασία της ενεργοποίησης των μακροφάγων. Επιπρόσθετα, η βιταμίνη D φαίνεται να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο<sup>16,23,31</sup>.

Οι μηχανισμοί καταστροφής του μυκοβακτηριδίου από τα μακροφάγα στον άνθρωπο δεν είναι ακόμα πλήρως διευκρινισμένοι, παρά τη πληθώρα των *in vitro* και πειραματικών δεδομένων. Στους ευρέως αποδεκτούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται η παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων του οξυγόνου (ROI) και του αζώτου (RNI), η οξινοποίηση του φαγοσώματος και η συγχώνευσή του με το λυσοσωμάτιο, και η απόπτωση.

#### ***ROI***

Η φαγοκυττάρωση των μυκοβακτηριδίων ενεργοποιεί το ένζυμο NADPH-οξειδάση που καταλύει την παραγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου. Από το τελευταίο προέρχονται ελεύθερες τοξικές ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του οξυγόνου κλπ με τις οποίες αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός του μυκοβακτηριδίου. Σε πειραματόζωα η δυσλειτουργία της NADPH-οξειδάσης συσχετίζεται με αυξημένη ανάπτυξη μυκοβακτηριδίων, κάτι που υποδηλώνει συμμετοχή των ROI στη καταστροφή του μυκοβακτηριδίου. Παρά ταύτα, νεώτερα δεδομένα υποβαθμίζουν το ρόλο των ROI στη καταστροφή των μυκοβακτηριδίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Για παράδειγμα, η φαγοκυττάρωση μέσω των υποδοχέων MR δεν ενεργοποιεί την παραγωγή ριζών οξυγόνου. Επίσης, διάφορα προϊόντα του μυκοβακτηριδίου, όπως οι σουλφατίδες και το LAM δυνατό να καταστέλλουν την παραγωγή ή να εξουδετρώνουν την δράση των τοξικών ριζών του οξυγόνου<sup>16,33</sup>.

#### ***RNI***

Ο ρόλος των RNI στη καταστροφή των μυκοβακτηριδίων, αν και αμφισβητούμενος, φαίνεται να είναι σημαντικότερος από αυτό των ROI. Τα RNI παράγονται από την L-αργινίνη μέσω της ενεργοποίησης NO συνθετάσης. Μεταξύ των άλλων ενδιάμεσων παράγονται NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> και NO<sub>3</sub><sup>-</sup> τα οποία συμβάλλουν στην αναστολή της ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων. Η μόλυνση ανθρώπινων κυψελιδικών μακροφάγων με μυκοβακτηρίδιο *bovis* BCG προκαλεί αύξηση του mRNA της επαγωγίσιμης NO συνθετάσης (iNOS), ενώ η αναστολή της iNOS συνοδεύεται με αύξηση του μυκοβακτηριδιακού πολλαπλασιασμού. Επίσης σε φυματικούς ασθενείς τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή iNOS<sup>16,34</sup>.

#### ***Οξινοποίηση του φαγοσώματος και η συγχώνευσή του με το λυσοσωμάτιο***

Μετά τη ενδοκυττάρωση τα μυκοβακτηρίδια τυπικά εντοπίζονται στα ειδικά φαγοσώματα τα οποία υφίστανται σταδιακή οξινοποίηση και στη συνέχεια συγχώνευση με τα λυσοσώμια. Με την διαδικασία αυτή αναστέλλεται η ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων.

Η πρωτεΐνη 1 των μακροφάγων που σχετίζεται με την φυσική αντίσταση αυτών (Natural resistance-associated macrophage protein, NRAMP1) κωδικοποιείται από το Nramp1

γονίδιο (παλαιότερα Bcg γονίδιο). Εντοπίζεται στα ενδοσώματα των μη ενεργοποιημένων μακροφάγων και ανευρίσκεται στα φαγοσώματα κατά τη φαγοκυττάρωση. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που υποστηρίζουν το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη πρωτεΐνη να αποτελεί μεταφορέα μεταλλικών ιόντων και ιδιαίτερα σιδήρου, που κορρένεται επί υψηλών συγκεντρώσεων αυτού. Τα μεταλλικά ιόντα εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και στη παραγωγή τοξικών αντιμικροβιακών ριζών.

Ο σίδηρος αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου. Έχει βερεθεί ότι το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης διαθέτει κάποιο από τα μέλη της οικογένειας Nramp (καλούμενο Mramp) που ενέχει θέση μεταφορέα σιδήρου και άλλων μεταλλικών κατιόντων και που δρα σε όξινο κυρίως περιβάλλον, όπως αυτό των φαγοσωμάτων. Έτσι είναι πολύ πιθανό η Nramp1 και η Mramp να ανταγωνίζονται για σίδηρο εντός του φαγοσώματος. Η έκβαση αυτού του ανταγωνισμού καθορίζει εν πολλοίς και την περαιτέρω τύχη του πολλαπλασιασμού του μυκοβακτηριδίου.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η υπερφόρτωση σιδήρου αποτελεί παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης φυματίωσης. Σε ποντίκια μεταλλάξεις του γονιδίου Nramp1 συνοδεύονται με μειωμένη ωρίμανση και οξינוποίηση των φαγοσωμάτων. Επιπρόσθετα, γενετικές μελέτες στον άνθρωπο δείχνουν ότι διάφοροι πολυμορφισμοί του γονιδίου Nramp1 συσχετίζονται, αν και όχι ισχυρά, με ευαισθησία έναντι της φυματίωσης<sup>12,16,33</sup>.

#### **Απόπτωση.**

Η απόπτωση των φαγοκυττάρων ίσως αποτελεί ένα ακόμα πιθανό μηχανισμό περιορισμού της ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου. Πρόκειται για προγραμματισμένο θάνατο του φαγοκυττάρου που επηρεάζει τη βιωσιμότητα των ενδοκυττάρων μυκοβακτηριδίων, κάτι που δεν παρατηρείται με την μη προγραμματισμένη καταστροφή του φαγοκυττάρου. Κατά τη διάρκεια της φυματικής μόλυνσης η απόπτωση οδηγεί σε εγγενή έλεγχο της πρώιμης βακτηριακής ανάπτυξης και δρα ως δεξαμενή αντιγόνων που διευκολύνει την έναρξη της κυτταρικής ανοσίας μέσω της ευαισθητοποίησης των δενδριτικών κυττάρων. Ο ρόλος της απόπτωσης διερευνήθηκε μερικώς με την ανακάλυψη του γονιδίου *Irp1* η παρουσία του οποίου περιορίζει το πολλαπλασιασμό του μυκοβακτηριδίου και οδηγεί τα μολυσμένα μακροφάγα στην απόπτωση. Επίσης για την πρόκληση της απόπτωσης είναι απαραίτητη η παρουσία του TNF-α. Η προσταγλανδίνη E2 προάγει την απόπτωση ενώ αντίθετα η λιποξυγενάση A4 την καταστέλλει<sup>36</sup>.

#### **Τροποποίηση της ανοσιακής απάντησης από το μυκοβακτηρίδιο**

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης επιστρατεύει διάφορους μηχανισμούς προκειμένου να τροποποιήσει και να αχρηστεύσει την ανοσιακή αντίδραση που στρέφεται εναντίον του. Η παρέμβαση του αφορά τόσο στη σύμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία<sup>16,31,33</sup>.

Σε μόλυνση με παθογόνα μυκοβακτηρίδια προκαλείται μικρότερου βαθμού απόπτωση από ότι σε μόλυνση με εξασθενημένα ή μη παθογόνα μυκοβακτηρίδια. Αυτό αποδίδεται σε εκλεκτική πρόκληση παραγωγής και απελευθέρωσης διαλυτών υποδοχέων TNF-α από το μυκοβακτηρίδιο δια των οποίων εξουδετερώνεται η δράση του TNF-α. Η απελευθέρωση των διαλυτών υποδοχέων ρυθμίζεται από την IL-10. Έτσι, τα παθογόνα μυκοβακτηρίδια πιθανό να προκαλούν παραγωγή της IL-10, που οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα του TNF-α και μείωση της απόπτωσης των μολυσμένων κυττάρων. Η υπερέκφραση του fas ligand στα μολυσμένα μακροφάγα και διάφορα προϊόντα του

μυκοβακτηριδίου, όπως είναι το LAM είναι δυνατό να μειώνουν την απόπτωση και άρα το βαθμό καταστροφής των μυκοβακτηριδίων<sup>36</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε το μυκοβακτηρίδιο προσλαμβάνεται από κύτταρα που διαθέτουν φαγοκυτταρικές ικανότητες και πρωτίστως από τα κυψελιδικά μακροφάγα.. Παραμένει μέσα στα δημιουργούμενα φαγοσώματα και δεν διαφεύγει προς το κυτταρόπλασμα. Ακολούθως, τα φαγοσώματα συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα που περιέχουν πληθώρα ενζύμων και κυρίως όξινων πρωτεασών καταστροφικών για το μυκοβακτηρίδιο. Το τελευταίο είναι σε θέση να ακυρώσει τη διαδικασία της συγχώνευσης. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι εν πολλοίς άγνωστοι.

Η πολύπλοκη διαδικασία της ωρίμανσης των φαγοσωμάτων ελέγχεται από διάφορα μόρια μεταξύ των οποίων είναι και μικρές GTP-άσες, οι Rabs. Οι Rab 4, Rab 5 και Rab11 ανιχνεύονται σε πρώιμα φαγοσώματα, ενώ οι Rab7 και Rab9 στα ώσιμα φαγοσώματα. Σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διαδικασία ωρίμανσης η Rab5 μετατρέπεται σε Rab7. Σε πρώιμες σχετικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι τα μυκοβακτηριακά φαγοσώματα φέρουν Rab5 όχι όμως και Rab7. Φαίνεται λοιπόν ότι το μυκοβακτηρίδιο, κατά άγνωστο εν πολλοίς μέχρι τώρα τρόπο, αποτρέπει την μετατροπή του Rab5 σε Rab7, μπλοκάροντας έτσι τη διαδικασία της φαγολυσοσωματικής συγχώνευσης ή όπως καλείται σήμερα βιογένεσης<sup>37</sup>.

Νεώτερες μελέτες έχουν δείξει ότι στην αποτροπή της συγκεκριμένης διαδικασίας εμπλέκονται διάφορα δραστικά μόρια που συσχετίζονται με την Rab5 και κυρίως η phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) hVPS34, το προϊόν αυτής phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) και μια σειρά από πρωτεΐνες που συνδέονται με την PI3P. Η PI3P δεσμεύει συγκεκριμένες πρωτεΐνες με λειτουργικές θέσεις FYVE. Δύο από αυτές το EEA1 (early endosomal autoantigen 1) και η Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), κατακρατούμενες κατ'αυτό το τρόπο, βοηθούν στη συγχώνευση των φαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα. Σε μόλυνση με παθογόνα ζώντα μυκοβακτηρίδια έχει παρατηρηθεί απελευθέρωση τους και απουσία συγχώνευσης. Τούτο αποδίδεται σε αποδομή της PI3P που προκαλείται από μόρια των μυκοβακτηριδίων<sup>37</sup>.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες κατά τη φαγοκυτταρώση παρατηρείται αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  και συσσώρευση της εξαρτώμενης από το  $Ca^{2+}$  και τη δεσμεύουσα αυτό καλμοδουλίνη, κινάση II (phosphorylated calcium/calmodulin-dependent kinase II) στη κυτταροπλασματική επιφάνεια των φαγοσωμάτων. Η τελευταία επιστρατεύει την (PI3K) hVPS34, που όπως προαναφέρθηκε είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή της PI3P. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η φαγοκυττάρωση ζώντων μυκοβακτηριδίων δεν συνοδεύεται από αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της PI3P<sup>38</sup>.

Μια άλλη πρωτεΐνη, που συσσωρεύεται κατά τρόπο ενεργητικό στα μυκοβακτηριακά φαγοσώματα, είναι η coronin 1, γνωστή και ως TACO (tryptophan aspartate containing coat protein). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, που διαθέτει δράση F-ακτίνης, φαίνεται να σχηματίζει προστατευτικό κλοιό γύρω από το φαγόσωμα αποκλείοντας την ωρίμανση ή συγχώνευση του με τα λυσοσώματα. Τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε in vitro μελέτες με ανθρώπινα φαγοκύτταρα<sup>39</sup>.

Πολλά λιπίδια των μυκοβακτηριδίων φαίνεται να παίζουν ρόλο στη τροποποίηση των κυττάρων του ξενιστή. Από τα πλέον σημαντικά είναι το lipoarabinomannan (LAM) και το glycosylated phosphatidylinositol lipoarabinomannan (ManLAM). Το τελευταίο, που θεωρείται ανάλογο του PI3P, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την αύξηση του ενδοκυττάρου

ασβεστίου που παρατηρείται κατά τη φαγοκυττάρωση και ότι συμβάλλει στην αναστολή της ωρίμανσης των φαγοσωμάτων. Πιθανό να ασκεί αυτές του τις δράσεις μειώνοντας τη παραγωγή της PI3P ή ανταγωνιζόμενο αυτή στη δέσμευση των πρωτεϊνών με λειτουργικές θέσεις FYVE<sup>40</sup>.

Η SapM είναι ο δεύτερος παράγοντας του μυκοβακτηριδίου που επηρεάζει τα επίπεδα του PI3P μέσα στα μυκοβακτηριδιακά φαγοσώματα. Προσομοιάζει με τις ευκαριωτικές όξινης φωσφατάσες, κωδικοποιείται στο γένωμα του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης και εκκρίνεται μέσα στα φαγοσώματα. Πρόκειται στην ουσία για PI3P φωσφατάση που αποδομή την PI3P του ξενιστή και κατ'επέκταση δυσκολεύει ή και αποκλείει την δημιουργία του φαγολυσσοσώματος. Η φαρμακολογική αναστολή της SapM μειώνει την ικανότητα των μυκοβακτηριδίων να διατηρούν φαγοσώματα ελεύθερα PI3P και επιταχύνει την δημιουργία των φαγολυσσοσωμάτων<sup>43</sup>.

Σε πειράματα με ανθρώπινα μονοπυρηνά έχει βρεθεί ότι το LAM ενεργοποιεί την φωσφατάση SHP-1 που με τη σειρά της συσχετίζεται με την αναστολή των ενεργοποιούμενων από μιτογόνο κινασών. Έτσι μέσω της SHP-1 μπορεί να ασκεί περαιτέρω ανασταλτική δράση, όπως μείωση του TNF- $\alpha$ , της IL-12 και των MHC II μορίων σε μολυσμένα μακροφάγα<sup>40</sup>.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί τρεις τουλάχιστο μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία επιβίωσης των μυκοβακτηριδίων μέσα στα μακροφάγα, η προαναφερθείσα εκκρινόμενη όξινη φωσφατάση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (SapM), η ισοκιτρική λυάση (ICL) και η πρωτεϊνική κινάση G (PknG). Η συμμετοχή της δεύτερης επιβεβαιώνεται εκ του αποτελέσματος. Η απουσία του γονιδίου της ICL από τα μυκοβακτηρίδια, ενώ δεν περιορίζει την ικανότητα μόλυνσης, συνδυάζεται με μειωμένη επιβίωση επί χρόνιας λοίμωξης<sup>41</sup>.

Η PknG ανήκει στην οικογένεια των Ser/Thr πρωτεϊνικών κινασών και βρίσκεται κωδικοποιημένη στο γένωμα των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης. Πρόκειται για κινάση μη απαραίτητη για τη βιωσιότητα και την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου έξω από τα μακροφάγα. Εντούτοις, μετά την είσοδο του στα μακροφάγα, φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αποτροπή της συγχώνευσης των μυκοβακτηριδιακών φαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα. Εκκρινόμενη από τα μυκοβακτηρίδια με άγνωστο μηχανισμό, η PknG ανιχνεύεται μέσα στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων φαγοκυττάρων. Η κατάργηση του σχετικού γονιδίου ή η απουσία της PknG, όπως συμβαίνει επί μόλυνσεως με μυκοβακτηρίδιο smegmatis, τα παθογόνα μυκοβακτηρίδια παραδίδονται ταχέως στα λυσοσώματα, όπου και αποδομούνται. Επίσης, το ίδιο παρατηρείται επί ειδικού αποκλεισμού της PknG<sup>42</sup>.

Τα μυκοβακτηρίδια, εκτός από την αναστολή της συγχώνευσης των φαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα, είναι σε θέση επίσης να διατηρούν το PH των μυκοβακτηριδιακών φαγοσωμάτων σε υψηλά επίπεδα (PH 6.3-6.5) σε σχέση με αυτό των λυσοσωμάτων (PH 4.5). Τούτο το επιτυγχάνουν με ενεργό παραγωγή H<sup>+</sup> ATP-ασών, δημιουργώντας έτσι ακατάλληλο περιβάλλο για τη δράση ποικίλων δαστικών ουσιών των λυσοσωμάτων, που χαρακτηριστικά δρουν σε όξινο περιβάλλο. Επίσης μέσω υπεροξειδικών δισμουτασών και άλλων ενζύμων που παράγουν, πιθανό να αποφεύγεται η καταστροφή τους με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή οξειδία του αζώτου<sup>44</sup>.

Πέραν των ανωτέρω, που αφορούν κυρίως στη σύμφυτη ανοσία, τα μυκοβακτηρίδια διαθέτουν και μια ποικιλία μηχανισμών επηρεασμού της επίκτητης ανοσίας, με αποτέλεσμα πάντοτε την επιβίωσή τους. Για παράδειγμα, παράγοντες που πρόερχονται



από τα μυκοβακτηρίδια είναι σε θέση να διεγείρουν τα μακροφάγα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παράγουν υπέρμετρα κυτταροκίνες που αναστέλλουν τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων. Σε αυτές περιλαμβάνονται η IL-10 και ο TGF-β1. Η επικαλυπτόμενη βιολογική δράση των δύο αυτών κυτταροκινών αφορά στην καταστολή των T-λεμφοκυττάρων, στην απενεργοποίηση των μακροφάγων, στη ρύθμιση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και στη τροποποίηση της διαδικασίας της αντιγονοπαρουσίασης. Η εκσεσημασμένη παραγωγή αυτών των κυτταροκινών, που παρατηρείται σε ενεργό φυματίωση, αναστέλλει τη δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και επηρεάζει άμεσα και αρνητικά τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων<sup>33,38,44,45</sup>. Με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνονται αυτά είναι άγνωστο.

Η IFN-γ παίζει σημαντικό ρόλο στην απάντηση του ξενιστή σε μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Επί φυματίωσης η IFN-γ αποτελεί καίριο παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων μέσω της πρόκλησης μετάφρασης 200 και πλέον γονιδίων. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν τη συνθετάση του νιτρικού οξειδίου ((NOS<sub>2</sub>) και της φαγοκυτταρικής οξειδάσης που συνδέονται με τα βλαπτικά για το μυκοβακτηρίδια ενδιάμεσα του αζώτου και του οξυγόνου αντίστοιχα. Επίσης η IFN-γ προάγει την αντιγονοπαρουσίαση προς τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα μέσα από την ευόδωση της παραγωγής των μορίων MHC II. Στους τόπους της μόλυνσης, ακόμα και μέσα στα φυματίωματα η IFN-γ ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα<sup>44,47</sup>. Παρά ταύτα οι πυροδοτούμενοι σχετικοί μηχανισμοί καταστροφής των μυκοβακτηρίων αποτυγχάνουν να τα εξαλείψουν. Αυτό αποδίδεται εν μέρει στην εκλεκτική αναστολή της αντίδρασης των μακροφάγων στην IFN-γ που πιθανό να προκαλείται

Μετά τη δημιουργία του φαγολυσωσώματος οι πρωτείνες του μυκοβακτηριδίου αποδομούνται σε πεπτίδια. Τα μόρια MHC II συγκεντρώνονται στα όψιμα φαγολυσωσώματα και σχηματίζουν συμπλέγματα με τα μυκοβακτηριδιακά πεπτίδια βοηθώντας και του όξινου περιβάλλοντος. Στη συνέχεια τα συμπλέγματα μεταφέρονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων και παρουσιάζονται στα CD4+ λεμφοκύτταρα.

Σε μακροφάγα τρωκτικών αλλά και ανθρώπων, η μόλυνση με μυκοβακτηρίδια συνοδεύεται από μειωμένη έκφραση των CIITA ( class II transactivator), των MHC-II, αλλά και των CD64(Fcγ RI), μετά από ερεθισμό με IFN-γ. Επίσης μετά από παρατεταμένη μόλυνση των μακροφάγων με μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης, η προκαλούμενη από την IFN-γ έκφραση των CIITA και MHC-II αναστέλλεται, με αποτέλεσμα την μειωμένη σχετική αντιγονοπαρουσίαση προς τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα και κατ'επέκταση της ειδικής ενεργοποίησής τους<sup>48</sup>.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τρία τουλάχιστο μόρια του μυκοβακτηριδίου εμπλέκονται στη διαδικασία αναστολής της δράσης της IFN-γ επί των μακροφάγων, η λιποπρωτεΐνη 19kDa LpqH, η λιποπρωτεΐνη 24kDa LprG, και η πεπτιδογλυκάνη mAGP. Η τελευταία φαίνεται πιθανό να ασκεί τη δράση της μέσω των TLR4 υποδοχέων κατά τρόπο ανεξάρτητο του MyD88. Οι λιποπρωτεΐνες LpqH και LprG είναι αγωνιστές των TLR2 σε συνδυασμό με MyD88. Η οξεία σηματοδότηση από τους TLR2 έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση TNF-α και IL-12 που προάγουν τόσο την ενεργοποίηση της σύμφυτης ανοσίας όσο και την αντιγονοπαρουσίαση προς τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα και κατ'επέκταση την ενεργοποίησή τους. Αντίθετα, η παρατεταμένη έκθεση των ίδιων μακροφάγων στις αναφερόμενες λιποπρωτεΐνες έχει αν αποτέλεσμα τη σημαντική αναστολή της διεργασίας της MHC-II αντιγόνο-επεξεργασίας και παρουσίασης. Τούτο

μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των TLR4 υποδοχέων και τη παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών<sup>49</sup>.

Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι η σηματοδότηση από τις λιποπρωτεΐνες μέσω των TLR αντιπροσωπεύει ένα δίκτυο μαχαίρι για την αντίδραση του ξενιστή σε χρόνια ενδοκυττάρια παθογόνα. Η βραχεία σηματοδότηση μέσω των TLR ενεργοποιεί τα μακροφάγα και αποτελεί το έναυσμα τοπικής οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης που βοηθά στον έλεγχο της αρχικής μόλυνσης. Αντίθετα, η παρατεταμένη σηματοδότηση έχει σαν αποτέλεσμα τη έκπτωση σημαντικών ανοσολογικών λειτουργιών, όπως είναι η αντιγονοπαρουσίαση. Η επιβίωση και παραμονή του μυκοβακτηριδίου στα μακροφάγα του προσδίδει το πλεονέκτημα, μέσα από τη χρήση διαφόρων συστατικών μορίων του, να παρέμβει και να διαφύγει των ανοσολογικών μηχανισμών.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι τα μυκοβακτηρίδια χρησιμοποιούν ποικίλους μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής που διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο της φυματικής μόλυνσης. Η τροποποίηση του φαγοσώματος και η αναστολή των φαγοκυτταρικών μικροβιοκτόνων μηχανισμών είναι κρίσιμα κατά την αρχική φάση, προ της ανάπτυξης της επίκτητης ανοσίας. Η παραγωγή ανασταλτικών κυτταροκινών, όπως είναι η IL-10 και ο TNF- $\beta$  είναι περισσότερο έκδηλη κατά την ενεργό φυματίωση, όπου τα μυκοβακτηρίδια επικρατούν των αμυντικών μηχανισμών. Η αναστολή της MCH-II αντιγονο παρουσίασης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη χρόνια φάση της μόλυνσης.

## Σύνοψη

Για την αντιμετώπιση των μυκοβακτηριδίων, ο ανθρώπινος οργανισμός επιστρατεύει σύμφυτους και επίκτητους αμυντικούς μηχανισμούς. Μετά την πρόσληψη των μυκοβακτηριδίων από τα κυψελιδικά μακροφάγα ακολουθούν διάφορα σενάρια. Ένα από αυτά είναι και η καταστροφή τους, οπότε στη συνέχεια δεν αναπτύσσεται οποιαδήποτε επίκτητη ανοσία. Στη περίπτωση που τα μυκοβακτηρίδια επιζήσουν και αναπτυχθούν, ακολουθεί μια τοπική μη ειδική φλεγμονώδης αντίδραση, που ρυθμίζεται από ένα δίκτυο μεσολαβητικών παραγόντων. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται προ- και αντι- φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοτακτικοί παράγοντες. Κατά τη φάση αυτή οι περισσότεροι εμπλεκόμενοι παράγοντες προέρχονται κυρίως από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα τελευταία είναι επίσης υπεύθυνα για την παρουσίαση των μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων στα T λεμφοκύτταρα. Με την ειδική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και την προκαλούμενη εξ αυτής συστράτευση και άλλων ανοσορρυθμιστικών κυττάρων και ενεργοποίηση των μακροφάγων, δομείται αρχικά μια οξεία επίκτητη κυτταρική ανοσία, που αποσκοπεί στον έλεγχο των ταχέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων. Αυτή ακολουθείται από μια μνημονική ανοσιακή φάση, που είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των επιζώντων και λαθροβιούντων μυκοβακτηριδίων και την επιτήρηση για πιθανή επαναμόλυνση. Η ικανότητα του μυκοβακτηριδίου να διαφεύγει των αμυντικών μηχανισμών και η ανεπάρκεια της σύμφυτης ή της επίκτητης κυτταρικής ανοσίας κατά την οξεία ή χρόνια φάση της, έχει σαν αποτέλεσμα την κλινική εκδήλωση και διασπορά της φυματίωσης.

## Βιβλιογραφία

1. WHO/HTM/TB/2006.362
2. Raja A. Immunology tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120:213-232.
3. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gegring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M.tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* 2003; 83:98-106.
4. Dannenberg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses- Dual mechanisms that control bacillary multiplication. In *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Ed R.Bloom/ American Society for Microbiology 1994; pp 459-483.
5. Lurie MB, Abramson S, Heppleston AG. On the response of genetically resistant and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human-type tubercle bacilli and the nature of resistance to tuberculosis. *J Exp Med* 1952; 95: 119-134.
6. Sousa AO, Salem JI, Lee FK, Vercosa MC, Cruaud P, Bloom BR, LagrangePH, David HL. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *ProcNatl Acad Sci USA* 1997;94:13227–13232.
7. Stead WWJ, Senner W, Reddick WT, Lofgren JP. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1990; 322:422–427
8. Crowle AJ, Elkins N. Relative permissiveness of macrophages from black and white people for virulent tubercle bacilli. *Infect Immun* 1990; 58:632–638.
9. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998; 338:640–644.
10. Colditz, GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F.. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271:698–702.
11. North RJ, LaCourse R, Ryan L. Vaccinated mice remain more susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection initiated via the respiratory route than via the intravenous route. *Infect. Immun.* 1999; 67:2010–2012.
12. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: The importance of host genetics. *Genes and Immunol* 2003; 4:4-11.
13. Pasula RJR, Wright DL, Kachel, Martin WJ.. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Investig* 1999; 103:483–490.
14. Ferguson JS, Voelker DR,. McCormack FX, Schlesinger LS. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J. Immunol* 1999; 163:312–321
15. Selvaraj PP, Narayanan R, A. M. Reetha AM Association of functional mutant homozygotes of the mannose binding protein gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis in India. *Tuber. Lung Dis* 1999; 79:221–227.

16. van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clin Microb Rev* 2002; 294-309.
17. Zimmerli S, Edwards S, and Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1999; 15(6):760–770
18. Hemmi HO, Takeuchi, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo S, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740–745.
19. Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question. Does TLR signaling hold the answer? *J. Clin. Invest.* 2004, **114**:1699–1703
20. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96:14459–14463
21. Akira S. Toll like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278(40), 38105-38108.
22. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011; ID 4053310, doi; 10, 1155/2011/405310.
23. Saiga H, Shimada Y, Takeda K Innate Immune Effectors in Mycobacterial Infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011; ID 347594, doi; 10, 1155/2011/347594.
24. Liu PT, Stenger S, Li H et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 2006, 311(5768): 1770–1773
25. Nishimura J, Saiga H, Sato S et al. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *Journal of Immunology*, 2008, 180 (6): 4032–4039
26. Saiga H, Nishimura J, Kuwata H et al., “Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium,” *Journal of Immunology*, 2008, 181(12): 8521–8527
27. Saitoh T and Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol.* 2010, 189(6):925-935
28. Berrington W, Hawn T. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev.* 2007; 219: 167–186.
29. Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 182:234-239.
30. Cooper A. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2009, 27:393–422
31. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to m.tuberculosis : T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* 2003; 83: 98-106.
32. Seah GT, Scott GM, Rook GAW. Type 2 cytokines gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 181: 385-389.

33. Jordao L, Vieira VO. Tuberculosis: New aspects of an old disease. *Int J Cell Biology*, 2011, doi 1155/2011/403623
34. Seah GT, Scott GM, Rook GAW. Type 2 cytokines gene activation and its relation ship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 181: 385-389
35. Rook GAW, Zumia A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2001; 7:116-123
36. Behar SM, Martin CJ, Booty MG et.al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*. 2011, 4(3): 279–287
37. Dertic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, Davis A, de Haro S, Naylor J, Lee H-H, Vergne I. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a hot. defence mechanism. *Cellular Microbiology* 2006; 8(5):719-727.
38. Mueller P, Pieters J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. *Immunobiology* 2006; 211:549-556.
39. Schuller S Neefjes J, Ottenhoff T, Thole J, Young D. Coronin is involved in uptake of *mycobacterium bovis* BCG in human macrophage but not in phagosome maintenance. *Cellular Microbiology* 2001; 3(12):785-793.
40. Vergne I, Chua J, Lee H-H, Lukas M, Belisle J, Deretic V. Mechanisms of phagolysosome biogenesis block by viable *mycobacterium tuberculosis*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4033-4038.
41. McKinney J, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias E, Miczak A, Chen B, Chan M, et al. Persistence of *mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000; 406:735-738.
42. Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Precia-notto Basschong C, Huegen K, Klebl B, Thopson C, Bacher G, Pieters J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 2004; 304:1800-1804.
43. Salch M, Belisle J. Secretion of an acid phosphatase (SaPM) by *mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases *J Bacteriol* 2000; 182:6850-6853.
44. Houben E, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9:76-85.
45. Jang S, Uematsu S, Akira S Salgame P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in respons to *mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* 2004; 173:3392-3397.
46. Hirsch CS, ToossiZ, Johnson J, Luzze H, Ntambi L. Peters P, McHugh M, Okwera A, Joloba M, Mugenyi P, Mugerwa R, Terebuh P, Ellner J. Augmentation of apoptosis and interferon –g production at sites of active *mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2001; 183:779-883.
47. Kaufman S, Cole S, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *JEM* 2005; 11:1693-1697
48. Torres M, Ramachandra L, Rojas R, Bobadilla K, Thmas J, Canaday D, Harding C, Boom H. Role of phagosomes and Major Histocompatibility complex class II (MHC-II) compartment in MHC-II antigen processing of *mycobacterium*

- tuberculosis in human macrophages. *Inf Immun* 2006; 74.3:1621-1630.
49. Gehring A, Doboss K, Belisle J, Harding C, Boom H. Mycobacterium tuberculosis LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 2004; 173:2660-2668.