

ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

ИММУНОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРЛОЗОНА У ПАЦИЕНТОВ С МЛУ/ШЛУ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Беляева Е.Н., Старшинова А.А., Маничева О.А.,
Догонадзе М.З., Зубрий О.Н., Соловьева Н.С.,
Сапожников Н.В., Вишневецкий Б.И.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

СПб ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2»,
Санкт-Петербург, Россия

Введение. Рост числа случаев заболевания туберкулеза с МЛУ/ШЛУ возбудителя требует персонализированного подхода к его терапии. Туберкулостатическая проба или бактериостатическая активность крови (ТСП/БАК) – это оценка *ex vivo* активности комплекса вводимых пациенту препаратов (на пике их концентрации в крови) в отношении выделяемого пациентом штамма МБТ (аутоштамма). Ранее было показано, что высокие значения ТСП/БАК (полученные пробирочным методом) соотносятся с клиническими параметрами эффективного лечения.

Цель и задачи. Определить эффективность перхлорона в отношении выделяемого пациентом штамма МБТ. Разработка объективного приборного способа регистрации результатов ТСП для лабораторного обоснования персонализированной химиотерапии у пациентов с МЛУ/ШЛУ и ее коррекции.

Материалы и методы. На базе СПб НИИФ и ГБУЗ «ГТБ № 2» в 2016 г было обследовано 20 пациентов с МЛУ/ШЛУ МБТ. Мужчины – 55,0% (11), женщины – 45,0% (9). Возраст 26–45 лет 65,0% (13); от 18–25 лет 25,0% (5); 46–60 лет 10,0% (2). Структура клинических форм: фиброзно-кавернозный 70,0% (14); инфильтративный у 20,0% (4), диссеминированный в 10,0% (2). Пробирочный метод определения ТСП/БАК перевели в формат метода микроразведений в 96-луночном планшете FLUOstarOptima. Кровь собирали на пике концентраций каждого из вводимых препаратов, подбор проводили в соответствии со спектром устойчивости аутоштамма, через неделю к терапии добавляли перхлорон и повторно проводили ТСП. Результат регистрировали визуально и в ридере, определяя точку задержки роста графически после статобработки с помощью программы MS Excel.

Результаты. На фоне проводимого лечения с включением перхлорона абациллирование к 2-м месяцам лечения наступило у 25,0 (5)%; к 4 месяцам у 50,0% (10,0); к 6-ти месяцам у 60,5% (12), к 8 – месяцам у 66,0 (13)% пациентов. Закрытие полости распада к 4 месяцам у 5,0% (1);

к 6-ти месяцам – у 10,0% (2), к 8 – месяцам у 15,0% (3). В 40,0% (8) случаев имеющиеся деструктивные изменения уменьшились в размерах в 2 раза, также отмечена значительная динамика рассасывания инфильтративных изменений в легочной ткани. Визуальная и графическая оценка ТСП отличались, отмечали расхождения параметров как в большую, так и в меньшую стороны. Равные или большие 5 значения ТСП, которые по полученным ранее данным соотносятся с клиническими показателями эффективности лечения, были зарегистрированы с помощью флуоресцентного ридера в 36,8+21,3% случаев, добавление перхлорона выявило тенденцию к увеличению этого показателя до 56,3+23,9%, при визуальной оценке теста – соответственно, 53,3+24,9% и 60,0+24,4 %. У 11 из 16 пациентов (68,7%) выявлена потенцирующая активность перхлорона, который усиливал действие противотуберкулезных препаратов в 2–64 раза, при визуальной оценке – у 46,7%. В среднем величина ТСП до и после введения перхлорона составила 4,4+0,9 и 6,4+1,4 ($p = 0,001$), при визуальной оценке – соответственно, 5,2+1,4 и 6,0+1,4 ($p = 0,324$).

Заключение. Препарат перхлорон обладает способностью у 68,7% пациентов с МЛУ/ШЛУ туберкулезом усиливать действие противотуберкулезных препаратов в 2–64 раза. Использование планшетного флуоресцентного ридера для регистрации интенсивности роста МБТ с помощью индикатора роста резазурина, позволяет избежать субъективности при проведении теста ТСП визуальным пробирочным или планшетным способом, объективно оценить *ex vivo*: активность комплекса вводимых препаратов, необходимость усиления химиотерапии.

ПОПУЛЯЦИЯ $\gamma\delta$ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург,
Россия

Введение. Изучение $\gamma\delta$ Т-клеток началось сравнительно недавно, их роль в иммунных процессах остается до конца не выясненной, однако многие исследователи отводят этим клеткам весьма существенную роль в обеспечении резистентности организма к микроорганизмам, в частности, к *M. tuberculosis*. Это обусловлено тем, что клетки имеют Т-клеточный рецептор, представленный гамма- и дельта-цепями, распознающий микробный фосфолипидный антиген (3-формил-1-бутил пиррофосфат), расположенный на *M. tuberculosis*, в результате чего клетки могут напрямую связываться с патогеном. **Целью** данного исследования стало изучение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток периферической крови при разных формах туберкулеза легких.

Материалы и методы. Исследованы иммунологические показатели крови больных, имевших один из трех вариантов туберкулезного воспалительного процесса: туберкулез легких с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы (31 человек, из них: 16 пациентов с туберкулезом в активной фазе, 15 больных – в фазе стихающей и умеренной активности), инфильтративный туберкулез легких (44 человека, из них: 29 обследованных с распространенностью процесса в пределах 1-3 сегментов доли легкого, 15 пациентов с распространенностью процесса более 3 сегментов, возбудитель имел множественную лекарственную устойчивость – МЛУ), фиброзно-кавернозный туберкулез легких (24 больных, возбудитель имел МЛУ), контрольная группа (25 практически здоровых людей). Больные инфильтративным туберкулезом распространенностью процесса 1-3 сегмента легкого были представлены 12 пациентами, у которых туберкулез был вызван лекарственночувствительными *M. tuberculosis* и 17 больными, у которых туберкулез вызван *M. tuberculosis* с МЛУ. Все обследованные не имели клинико-лабораторных данных наличия вирусных гепатитов В, С и ВИЧ 1, 2 типа. Исследования выполнены методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER Epics XL (Beckman Coulter, USA), с использованием реагентов того же производителя. Определены количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺) и γ Т-лимфоцитов (CD3^{bright}CD4⁺). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 и «Statistica for Windows v. 6.1.

Результаты. Установлено, что в изученных группах пациентов изменения в количестве этих клеток были различны и весьма существенны. Разброс значений был очень большим даже в контрольной группе и составлял от 0,008 до $0,203 \times 10^9$ /литр (0,4-9,4%). При отграниченных формах туберкулеза (туберкулемы) абсолютное количество этих клеток увеличилось почти в полтора раза (на 45,5%), относительное – на 36,4%. При двух других формах заболевания этот показатель заметно снижался: абсолютное число клеток в обеих группах снижалось более чем в 1,5 раза, относительное – на 27,3% при инфильтративном туберкулезе и на 39,4% при фиброзно-кавернозном туберкулезе в сравнении с группой здоровых лиц. Установлено также, что абсолютное количество этих клеток при туберкулемах в 2,3 раза превышало этот показатель при инфильтративном туберкулезе и в 2,5 раза – при фиброзно-кавернозном туберкулезе. У больных с лекарственночувствительным возбудителем снижение было наименьшим и составляло 18,2% в сравнении с контрольной группой. Наличие возбудителя с МЛУ сопровождалось понижением числа γ Т-клеток в 1,9 раза в сравнении с группой здоровых добровольцев. Также выявлено, что туберкулез 1-3 сегментов легкого сопровождался снижением числа клеток на 57,1%, а 4 и более сегментов – уже на 69,2%. Изучение количества клеток у больных с туберкулемами в разных фазах активности показало следующее. При активных туберкулемах количество этих клеток незначительно снижалось – на 12,1% – в сравнении с контрольными показателями. В подгруппе больных с туберкулемами в фазе стихающей активности число γ Т-клеток возрастало: в 2 раза в сравнении с группой доноров и в 2,3 раза в сравнении с подгруппой больных, имеющими туберкулемы в активной фазе.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что: во-первых, γ Т-клетки играют существенную роль в развитии туберкулезного процесса, их повышенное количество способствует усилению сопротивляемости ор-

ганизма пациента инфекции и отграничению туберкулезного процесса, а недостаточное количество – содействует активации патологического процесса; во-вторых, при противостоянии лекарственночувствительным *M. tuberculosis* небольшое снижение количества γ Т-клеток не является критичным, а значимое понижение числа этих клеток у больного является одним из прогностических критериев заболевания его туберкулезом, вызванным возбудителем с МЛУ; в-третьих, появление γ Т-клеток снижает вероятность развития распространенного (с поражением 4 и более сегментов легкого) патологического процесса.

РАЗРАБОТКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛЕМЫ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

Введение. Известны сложности определения фазы активности туберкулемы на этапе ее предполагаемой реакции. Лабораторные показатели периферической крови, отражающие реакцию иммунной системы на динамику туберкулезного процесса, являются перспективным инструментом для решения этой задачи. **Целью** исследования стало изучение иммунологических показателей периферической крови у больных с туберкулемами в активной фазе и фазе стихающей и умеренной активности для определения иммунологических критериев оценки активности туберкулемы.

Материалы и методы. Выполнено однократное исследование лабораторных показателей периферической крови, отражающих состояние основных звеньев иммунной системы 92 человек обоего пола в возрасте от 18 до 55 лет. Три группы обследованы: контрольная – 25 практически здоровых людей, опытная – 31 больной туберкулезом легких с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы, тестовая, для проверки статистических гипотез – 36 человек, сопоставимая с контрольной и опытной по полу и возрасту. Все тестируемые не имели клинико-лабораторных признаков наличия вирусных гепатитов В, С и ВИЧ 1 и 2 типа. Больные с туберкулемами были дифференцированы на две подгруппы в зависимости от фазы активности процесса: с туберкулезом в активной фазе (1 подгруппа, 16 человек), с туберкулезом в фазе стихающей и умеренной активности (2 подгруппа, 15 человек). Поглотительные и функционально-метаболические особенности фагоцитов оценивали методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER Epics XL (Beckman Coulter, USA), использовали наборы Phagotest и Bursttest (Glycotop Biotechnology, Germany). На фагоцитах определяли экспрессию маркеров CD11b, CD11c, HLA-DR. Выполняли подсчет количества Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺), В-лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺) и NK-клеток (CD45⁺CD3⁻CD16⁺56⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), γ Т-лимфоцитов (CD3^{bright}CD4⁺), NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺56⁺), Т-регуляторных клеток (CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺), клеток, экспрессирующих CD25, HLA-DR и CD95⁺. Концентрацию IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN γ , TNF α , MIF определяли методом твердофазного ИФА (реагенты eBioscience, Austria и RayBiotech Inc., USA). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica for Windows v. 6.1.

Результаты. Изучение показало, что особенности иммунологических реакций при активных туберкулемах связаны со снижением фагоцитарной и функционально-метаболической активности моноцитов ($p < 0,05$), повышением экспрессии на них CD11b и HLA-DR ($p < 0,05$), увеличением количества гранулоцитов с усилением их фагоцитарной активности, повышением экспрессии CD11b и CD11c ($p < 0,05$). Клеточный иммунитет у больных с активной туберкулезом характеризовался увеличением популяции лимфоцитов в периферической крови ($p < 0,05$), повышением экспрессии CD25 и HLA-DR на Т-лимфоцитах, CD95 – на Т-хелперах, снижением числа NK-, $\gamma\delta$ T-клеток. Т-лимфоцитов. Активность туберкулемы сопряжена с увеличением количества NKT-лимфоцитов ($p < 0,05$) и Treg-клеток ($p < 0,05$). Гуморальный иммунитет в этой подгруппе отличался подъемом концентрации IL-4, MIF и снижением уровня TNF α ($p < 0,05$).

Туберкулема в фазе стихающей и умеренной активности сопровождалась снижением фагоцитарной и функционально-метаболической активности моноцитов ($p < 0,05$) с понижением экспрессии HLA-DR, увеличением экспрессии CD25 и CD95 на Т-лимфоцитах и Т-хелперах ($p < 0,05$), а также снижением экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах ($p < 0,05$). У этих пациентов выявлено значительное снижение количества NK-клеток и увеличение $\gamma\delta$ T-клеток ($p < 0,05$), сопровождаемое повышением количества Treg-клеток и индекса CD4⁺/CD8⁺ ($p < 0,05$). Цитокиновый профиль отличался увеличением концентрации IL-1 β , MIF ($p < 0,05$), IL-2 (более чем в 600 раз в сравнении с контролем, в 2,9 раза в сравнении с данными пациентов, имеющих активные туберкулемы, $p < 0,05$), снижением IFN γ и TNF α ($p < 0,05$).

Заключение. С учетом выявленных изменений иммунологических показателей разработаны критерии определения активной туберкулемы легкого – увеличение экспрессии CD11b, HLA-DR на моноцитах, CD11b – на нейтрофилах, туберкулемы в фазе умеренной или стихающей активности – увеличение экспрессии CD25 на Т-хелперах, снижение HLA-DR на Т-лимфоцитах и понижение продукции O₂²⁻ гранулоцитами. Применение множественного регрессионного анализа позволило установить зависимость, позволяющую оценить фазу активности туберкулемы на основании уравнения, включающего оценку количества CD3-, CD4-, CD19-лимфоцитов, NK-клеток, а также экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах.

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Дьякова М.Е., Эсмедяева Д.С., Перова Т.Л.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Введение. Оксид азота (NO) участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток. Оксид азота может выступать также и как модулятор иммунного ответа.

Цель. Изучить взаимосвязь уровня NO с продукцией цитокинов у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ).

Материалы и методы. У 29 больных ФКТ в мононуклеарах (мн) и нейтрофилах (нф) крови изучали генерацию

стабильных метаболитов NO – по концентрации общего (NO₂⁻/NO₃⁻) и эндогенного (NO₂⁻) нитрита с помощью набора Total NO/Nitrite/Nitrate (R&D Systems, Канада). Уровень индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) – набором Human iNOS Immunoassay (USCN, КНР). Концентрацию цитокинов (IL-10, IL-17, IL-18), IFN γ , TNF α – в цельной крови, индуцированных PPD и не стимулированных, определяли с использованием тест-системы производства «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Результаты. У больных ФКТ выявлено снижение генерации общего и эндогенного нитрита мононуклеарами и нейтрофилами ($p = 0,000...$). Уровень экспрессии iNOS этими клетками определялся в пределах референсного диапазона.

Интенсивность базальной продукции цитокинов была разнонаправленной: повышение IL-18 ($p = 0,0015$), снижение TNF α ($p = 0,04$) и сохранение в пределах референсного диапазона продукции IL-10, IL-17 и IFN γ . Интенсивность секреции цитокинов, индуцированных специфическим антигеном PPD, была также разнонаправленной: рост IFN γ ($p = 0,001$) и IL-18 ($p = 0,0001$) наряду со снижением уровней TNF α ($p = 0,048$) и IL-10 ($p = 0,0028$). При этом уровень секреции IL-17 не отличался от референсного.

Выявлена ассоциированность между показателями нитрозилирующего стресса и продукцией цитокинов: прямая зависимость между экспрессией iNOS и продукцией IL-10 ($r = 0,80$; $p = 0,01$), обратная – с уровнем IL-17_PPD ($r = -0,91$; $p = 0,0015$); обратная корреляция между экспрессией iNOS мн и продукцией IL-17 ($r = -0,80$; $p = 0,03$), TNF α ($r = -0,94$; $p = 0,005$), IL-17_PPD ($r = -0,78$; $p = 0,04$) и прямая между экспрессией iNOS мн и уровнем IFN γ ($r = 0,79$; $p = 0,02$); обратная связь между генерацией NO₂ мн и продукцией IL-17 ($r = -0,84$; $p = 0,004$). Между базальной продукцией IFN γ и TNF α выявлена обратная корреляция ($r = -0,80$; $p = 0,03$).

Заключение. Отсутствие синергизма между базальной продукцией IFN γ и TNF α отражает их несостоятельность в индуцировании цитотоксического уровня NO. IFN γ один может индуцировать только нецитотоксические концентрации NO. Обнаруженный дефицит продукции TNF α может отражать функциональную инертность иммунцитов и, как следствие, хронизацию и прогрессирование туберкулезного процесса. Выявленные ассоциации между продукцией цитокинов и показателями нитрозилирующего стресса отражают их важную роль в иммунопатогенезе гиперхронического специфического процесса. Отмеченное у больных ФКТ снижение продукции эндогенного и общего нитрита может свидетельствовать об активации Th2, при которых ингибируется экспрессия iNOS и возрастает активность аргиназы, катаболизирующей субстрат для синтеза NO.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Истомина Е.В., Старшинова А.А., Чернохаева И.В.,
Назаренко М.М., Ланда С.Б., Филатов М.В.,
Яблонский П.К.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург,
Россия

Введение. Поиск дополнительных критериев определения активности туберкулезной инфекции является важным для возможности прогноза течения и развития

заболевания. Формирование эффективного противотуберкулезного иммунного ответа сопряжено с формированием иммунных комплексов, содержащих исключительно IgG3. Наличие иммунных комплексов, состоящих в основном из IgE, могут способствовать прогрессированию болезни.

Цель. Определение уровня и изотипа иммуноглобулинов IgG и IgE у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы. За период с 2015-2016 гг. на базе ФГБУ «СПбНИИФ» Министерства здравоохранения РФ обследовано 50 больных туберкулезом легких с бактериовыделением. Комплекс диагностики включал оценку клинической симптоматики, рентгенологические и бактериологические методы. Определение иммунных комплексов, содержащих IgE, IgG3, IgG1, IgG1 + IgG3, IgG1 + IgE (с помощью метода динамического светорассеяния). Обработка материала проводилась с использованием программы Statistica 7.0. Мы применили критерий хи-квадрат (χ^2). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Иммунные комплексы определялись у всех пациентов в рассеивании $7,25 \pm 0,34\%$, так же как IgG1 – $4,3 \pm 0,25\%$ и IgE – $3,48\%$, в 98% (49/50) были IgG3 – $3,2\% \pm 0,37\%$. Фракции иммуноглобулинов G и E имели место в 88,0% (44/50) IgG1 + IgG3 – $3,76\%$ и несколько реже в 74,0% (37/50) IgG1 + E – $5,71\%$, тогда как имели место только в 30,0% (15/50) IgG3 + IgE – $2,09$.

Заключение. Определение в одинаковом проценте случаев IgG1 и IgG3 (100%), также как IgE (100%) может свидетельствовать о полноправном запуске аллергической реакции при туберкулезе, что может объяснять появление в IgG1 + E и IgG3 + E комплексов. Полученные данные могут объяснять запуск иного механизма, нежели только инфекционный, в развитии туберкулеза.

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕСТЬЮ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Никитина И.Ю.¹, Пантелеев А.В.¹, Ганусов В.В.²,
Лядова И.В.¹

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

² Университет Теннесси, Ноксвилл, Теннесси, США

Исследования в области иммунопатогенеза туберкулеза (ТБ) являются актуальными и направлены на выяснение роли различных популяций клеток врожденного и адаптивного иммунитета в развитии противотуберкулезного ответа. Изменения соотношения между различными параметрами иммунного ответа являются факторами, влияющими на течение инфекции, и могут быть использованы для оценки активности ТБ и эффективности проводимой терапии.

В связи с этим целью исследования явился многопараметрический анализ различных популяций иммунных клеток и анализ их взаимосвязи с особенностями течения ТБ.

Материалы и методы. В исследование было включено 50 больных ТБ легких. С помощью проточной цитометрии были получены данные о 54 иммунологических показателях: Т- и В-лимфоцитах (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺), NK-клетках (CD16/56⁺); лимфоцитах CD4, продуцирующих различные комбинации цитокинов IFN γ , TNF α и IL-2 и других. Тяжесть ТБ определяли, оценивая фор-

му легочной патологии, уровень бактериовыделения, степень распространенности и деструкции в легких и тяжести интоксикации.

Для статистического анализа применяли корреляционный метод, кластерный анализ, множественную линейную регрессию. Точность статистических результатов подтверждали, используя метод «ресемиплинга» данных и проверки статистических гипотез на 1000 псевдовыборках (метод “bootstrapping”).

Результаты. Корреляционный анализ с критическим уровнем p -value = 0,006 выявил, что основными иммунологическими коррелятами клинических параметров были популяции лейкоцитов. В частности, процент лимфоцитов обратно коррелировал со всеми клиническими проявлениями ТБ, кроме формы легочной патологии. Наиболее достоверными были прямые корреляции между процентом нейтрофилов, степенью деструкции в легких и уровнем бактериовыделения ($p = 2 \times 10^{-3}$ и $p = 0,01$ соответственно). Кластерный анализ с использованием метода “bootstrapping” подтвердил, что ассоциации между популяцией нейтрофилов, степенью деструкции легочной ткани и уровнем бактериовыделения сохраняются в псевдовыборках (70 и 50% соответственно). Множественная регрессия показала, что одним из основных факторов, влияющих на изменение числа нейтрофилов в крови является степень деструкции в легких.

Заключение. Тяжесть ТБ не определяется недостаточностью «протективного» иммунного ответа лимфоцитов Th1, а возможно зависит от патологической иммунореактивности организма, ассоциированной с повышенным содержанием популяций нейтрофилов.

Работа поддержана грантом РНФ № 15-15-00136.

ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ Th1, Th17, Th1/Th17 ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Пантелеев А.В., Никитина И.Ю., Горелова Л.А.,
Космиади Г.А., Лядова И.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Введение. Протекция против туберкулеза (ТБ) была первоначально ассоциирована с генерацией лимфоцитов Th1 и продукцией ими IFN γ . Более поздние исследования показали вклад других популяций Т-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в контроль над микобактериями (Mtb), в частности – лимфоцитов Th17 и IL-17. При этом некоторые исследования поставили под вопрос роль и механизмы протективной активности лимфоцитов Th1 при ТБ, а при ряде других патологий были описаны популяции клеток, коэкспрессирующих цитокины типа 1 и IL-17, а также рецепторы, характерные для популяций Th1 и Th17. Роль и относительный вклад этих популяций в противотуберкулезный иммунный ответ и патологию при ТБ остается не до конца установленной.

Цель. Фенотипическая и функциональная характеристика лимфоцитов Th1, Th17 и Th1/Th17 и анализ количественных параметров их ответа при туберкулезе легких у людей.

Материалы и методы. В исследование были включены больные ТБ легких, проходящие лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ», здоровые люди, находящиеся в контакте с больными ТБ, здоровые доноры, не имеющие установленных контактов с больными ТБ. Клетки крови стимулировали антигенами Mtb и с помощью проточной

цитометрии определяли содержание Mtb-специфических лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих IFN γ , IL-17, и одновременно IFN γ и IL-17, экспрессию на них рецепторов CXCR3, CCR6, CD161, отличающих популяции лимфоцитов Th1, Th17 и Th1/Th17, экспрессию маркеров дифференцировки и функционального истощения клеток. Аналогичный подход был использован для определения содержания популяций Th1, Th17, Th1/Th17 в очаге инфекции в легочной ткани.

Результаты. Показано, что в крови больных ТБ и «контактов» среди лимфоцитов CD4⁺, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, преобладают лимфоциты с фенотипом CXCR3⁺CCR6⁺, характерным для популяции Th1/Th17. Среди Mtb-специфических лимфоцитов CD4⁺, у больных ТБ и «контактов» преобладают лимфоциты IFN γ ⁺IL-17⁻; содержание лимфоцитов IL-17⁺ существенно ниже, содержание лимфоцитов IFN γ ⁺IL-17⁺ незначительно. Несмотря на функциональную принадлежность лимфоцитов IFN γ ⁺IL-17⁻ к популяции Th1, их фенотип отличается от фенотипа «классических» лимфоцитов Th1 и характеризуется коэкспрессией рецепторов CXCR3, CCR6, CD161 («гибридный» фенотип, характерный для популяции Th1/Th17). Проведен сравнительный анализ фенотипа, степени дифференцировки, содержания лимфоцитов Th1, Th17, Th1/Th17 в крови больных ТБ и «контактов», в крови больных ТБ с различным течением ТБ процесса, в крови и легких больных ТБ. Полученные результаты позволяют предположить, что популяция Mtb-специфических лимфоцитов IFN γ ⁺IL-17⁻, экспрессирующих фенотип CXCR3⁺CCR6⁺, является менее дифференцированной по сравнению с популяцией «классических» лимфоцитов Th1, а увеличение содержания последних ассоциировано с большей активностью и тяжестью инфекционного процесса.

Заключение. Полученные результаты выявляют специфические характеристики ответа Th1 при ТБ, к которым относится преобладание среди Mtb-специфических лимфоцитов CD4⁺ клеток-продуцентов IFN γ и экспрессия данными клетками «гибридного» фенотипа CXCR3⁺CCR6⁺/CD161⁺. Увеличение содержания лимфоцитов Th1 в популяции CXCR3⁺CCR6⁺ отмечается при активном ТБ.

Работа поддержана грантом РНФ 15-15-00136.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СУПРЕССИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Уразова О.И., Есимова И.Е., Кононова Т.Е.,
Захарова П.В., Колобовникова Ю.В., Чурина Е.Г.

Сибирский государственный медицинский университет,
Томск, Россия

Многие инфекционные возбудители (в том числе *Mycobacterium tuberculosis*) способны вызывать супрессию иммунного ответа. Немаловажная роль в ее развитии отводится Т-регуляторным лимфоцитам (Treg), реализующим свое иммуносупрессорное действие посредством экспрессии поверхностных (CD25, CTLA-4) и внутриклеточных (транскрипционный фактор FoxP3) молекул, гранзимопосредованного цитолиза и секреции ингибиторных цитокинов (IL-10 и TGF- β). Однако остаются дискуссионными вопросы о том, какие конкретные патогенетические факторы и механизмы лежат в основе Treg-опосредованной иммуносупрессии при туберкулезе легких.

Цель. Определить роль и молекулярные механизмы Treg-опосредованной иммуносупрессии в иммунопатогенезе туберкулеза легких.

Материалы и методы. Обследованы 217 больных (149 мужчин и 68 женщин 41,94 \pm 10,63 лет) с впервые выявленным инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких (ИТЛ, ДТЛ) до лечения. Материал исследования: выделенные из крови лимфоциты и эозинофилы, ДНК, РНК. Методы исследования: иммунофенотипирование Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CTLA-4⁺, FoxP3⁺, IL-2⁺), оценка *in vitro* секреции IL-2, IL-10, TGF- β и содержания активных форм транскрипционных факторов внутриклеточной трансдукции сигнала (NF- κ B, AP-1 и NFAT2) в Т-лимфоцитах при моделировании *in vitro* их рецептор-зависимой активации с применением методов иммуоферментного анализа и проточной цитометрии, определение полиморфизмов генов цитокинов IL-10, TGF- β и мРНК гена *FoxP3* с использованием ПЦР.

Результаты. У больных ТЛ увеличение количества CD3⁺CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ Treg в крови сочеталось с повышением экспрессии мРНК гена *FoxP3* в лимфоцитах и гиперсекрецией *in vitro* ингибиторных Treg-цитокинов IL-10, TGF- β с наибольшей выраженностью при ДТЛ (соответственно, 1,12%, 4,88%, 7,25%, 27,72 отн.ед., 30,93 пг/мл, 1227,71 пг/мл; $p < 0,01-0,001$). Выявлены ассоциации между базальной и VCG-индуцированной *in vitro* гиперсекрецией IL-10, TGF- β и носительством полиморфных вариантов генов *C-592A* гена *IL10* (аллель *A* и генотипы *CA*, *AA*) и *C-509T* гена *TGF β* (аллель *T* и генотипы *CT*, *TT*), что свидетельствует о генетически детерминированной предрасположенности к иммуносупрессии у больных ТЛ. Однако Treg реализуют свое иммуносупрессорное действие не только посредством цитокинов, но и контактными способом — через экспрессию ингибиторной молекулы CTLA4 (инактивирует молекулы костимуляции на антигенпрезентирующих клетках (APC) и Т-лимфоцитах). При этом блокируются не только внеклеточный этап активации Т-лимфоцитов (посредством костимуляции при контакте с APC), но и внутриклеточный — проведение сигнала активации от поверхности клетки к генам синтеза IL-2 и его рецептора при участии транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и NFAT2, на что указывают результаты моделирования *in vitro* CD3/CD28-зависимой активации Т-лимфоцитов у больных ТЛ — снижение численности NF- κ B⁺, AP-1⁺, NFAT2⁺ и (до 9,80%) CD28⁺IL-2⁺ активированных Т-клеток при повышении количества Treg с фенотипом CD3⁺CTLA4⁺ (более 20%) ($p < 0,001$). У 18% больных ТЛ увеличение числа и цитокинсекреторной активности FoxP3⁺Treg ассоциировалось с эозинофильным лейкоцитозом до лечения (до [0,97 \pm 0,11] $\times 10^9$ /л, более выраженным при ДТЛ, чем при ИТЛ) во взаимосвязи с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легких. Обнаружены корреляции между количеством иммуносупрессорных Treg в крови и показателями пролиферации (отрицательные) и апоптоза (положительные) лимфоцитов, снижением базальной и VCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами (10,59 и 33,85 пг/мл, $p < 0,05$) при повышении базальной и VCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-2 эозинофильными гранулоцитами (666,23 и 670,45 пг/мл, $p < 0,05$) у больных ДТЛ. Ввиду того, что IL-2 — медиатор, в комбинации с TGF- β активирующий конверсию и функции Treg, гиперсекрецию IL-2 эозинофильными гранулоцитами в сочетании с эозинофильной реакцией крови можно рас-

ценивать как фактор, потенцирующий механизмы Treg-опосредованной иммуносупрессии при ДТЛ.

Заключение. Патогенетическими факторами Treg-опосредованной иммуносупрессии при ТЛ является повышение секреции ингибиторных цитокинов (IL-10, TGF- β) и экспрессии маркерных молекул (FoxP3, CTLA-4) с подавлением внеклеточного и внутриклеточного этапов рецептор-зависимой активации Т-лимфоцитов. Факторами, предрасполагающими к иммуносупрессии при ТЛ, являются полиморфизм генов *IL10* (C-592A), *TGF β* (C-509T) и эозинофильная реакция крови (эозинофилия) до лечения.

IL-18 И МАРКЕРЫ ДЕСТРУКЦИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Эсмедляева Д.С., Дьякова М.Е., Перова Т.Л., Васильев И.В., Кирюхина Л.Д.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Введение. Степень поражения легочной ткани напрямую зависит от состояния иммунной системы организма. IL-18, провоспалительный цитокин, экспрессируемый многими типами клеток, обладает широким спектром биологических эффектов: сдвигает баланс цитокинов в пользу клеточного иммунитета, стимулируя продукцию IFN γ , IL-2 и др., регулирует Fas-ligand опосредованный апоптоз. Наряду с TNF α , IL-17 и др. цитокинами участвует в стимуляции матриксных металлопротеиназ (ММП) – семейства внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса и к выбросу апоптозных лигандов (Fas).

Цель. Определить закономерности изменений IL-18 и системы ММП/ингибиторы в зависимости от хронической формы туберкулеза легких (ТЛ).

Материалы и методы. Обследовано 43 пациента ТЛ с длительностью заболевания более 2-х лет, с наличием распада, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы микобактерий. Среди них – 24 с туберкулемами (ТУБ) и 19 с фиброзно-кавернозным (ФКТ) ТЛ. В супернатантах мононуклеаров периферической крови определяли спонтанную и индуцированную фитогемагглютинином (РНА) и туберкулином (PPD) продукцию цитокинов (IL-18 и IFN γ) с использованием ИФА наборов ЗАО «Вектор Бест». Оценку внешнего пути активации апоптоза лимфоцитов проводили по экспрессии поверхностного фенотипа Fas (CD95⁺) и по окрашиванию конъюгатом аннексин-V (AnnV) с флуорохромом (FITC) и йодистым пропидием (PI) (Vecton Dickinson, USA) на проточном цитофлуориметре. В исследовании уровней коллагеназ (ММП-1,-8), желатиназы (ММП-9) и их ингибитора TIMP-1 в сыворотке крови использовали ИФА наборы (Biosource, USA). Расчет объемов деструкции проводили согласно результатам компьютерно-томографического обследования.

Результаты. Установлено, что ТУБ и ФКТ характеризуются значимым ростом абсолютного числа лимфоцитов, экспрессирующих CD95⁺, возрастанием числа AnV⁺ положительных клеток, не стимулированной продукцией цитокинов, не только относительно контроля, но и между собой. Индукция PPD вызывала увеличение продукции обоих цитокинов только при ТУБ. При ФКТ она была ниже контрольного уровня. Установлены связи IL-18 и IFN γ как между собой ($r = 0,69$, $p \leq 0,03$; $r = 0,87$, $p \leq 0,004$), так и с маркерами апоптоза, различающиеся в зависимости от характера стимуляции и объема поражения. При ТУБ активация IL-18 на PPD была связана с маркерами позднего апоптоза (AnnV+/PI+) ($r = 0,45$, $p \leq 0,03$), при ФКТ – с ранним апоптозом AnnV+/PI- наряду с продукцией IFN γ на PPD ($r = 0,48$, $p \leq 0,03$; $r = 0,43$, $p \leq 0,03$).

При обеих хронических формах ТЛ наблюдалось повышение уровней коллагеназ и желатиназы, не сопровождавшееся компенсированным повышением концентрации их ингибитора относительно контрольного уровня ($p \leq 0,05$), приобретающее значимые различия по мере увеличения объема деструкции. С учетом того, что основными источниками ММП-8 и -9 являются нейтрофилы и что по мере увеличения тяжести процесса наблюдается увеличение казеозно-некротических масс, полученная закономерность кажется логичной.

Продукция IFN γ была связана только с одной из коллагеназ (ММП-8) и TIMP-1 и определялась объемом поражения. При ТУБ изменения ММП-8 были противоположны продукции цитокина стимулированной PPD ($r = -0,41$, $p \leq 0,03$), при ФКТ – оставались на уровне контроля ($r = -0,52$, $p \leq 0,03$). Связи IL-18 с уровнями ММП и TIMP-1 установлено не было.

Участие цитокинов в активации апоптоза было установлено при анализе изменений липидного состава поверхности мембраны клетки, тогда как показатели системы ММП/ингибиторы были связаны с уровнем экспрессии Fas-рецептора, характеризующего потенциальную готовность клеток к рецепции апоптотического сигнала. При этом в случае ТУБ объем деструкции определялся взаимосвязью CD95⁺ с ММП-9 ($r = 0,55$, $p \leq 0,03$), при ФКТ – с уровнем желатиназы и ее ингибитора ($r = 0,45$, $p \leq 0,03$; $r = 0,48$, $p \leq 0,03$).

Заключение. Показана зависимость изменений IL-18 с IFN γ и маркерами апоптоза при хронических формах ТЛ. При ТУБ отмечался рост спонтанной и PPD стимулированной продукции обоих цитокинов. При ФКТ установлено увеличение спонтанной продукции IL-18 и IFN γ по сравнению с ТУБ, тогда как при стимуляции PPD наблюдалось их снижение ниже контрольного уровня, свидетельствующее о низком функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток. Нарушение соотношения уровня ММП/ингибитора в сторону протеаз, в большей степени выраженное при ФКТ, в сочетании с отрицательной связью с IFN γ , по-видимому, вызвано влиянием противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- β), способствующих хронизации процесса и увеличению объема распада.