

ОСОБЕННОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ОТДЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Кисина Т.Е., Фрейдлин И.С., Кноринг Б.Е.* , Басек Т.С.* ,
Елькин А.В.*

ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН;

*ФГУ НИИ Фтизиопульмонологии Росздрава

Резюме. Работа посвящена изучению различных проявлений ответа мононуклеаров крови больных фиброзно-кавернозным туберкулезом (ФКТ) легких на контакт со специфическими антигенами в составе туберкулина, в сопоставлении с ответом тех же клеток на стандартные митогены и на цитокин IFN γ . У больных туберкулезом обнаружены проявления выраженного клеточного специфического иммунного ответа, судя по повышенной пролиферации лимфоцитов крови в ответ на PPD и усиленной секреции этими клетками IL-2 и IFN γ в ответ на PPD. Вместе с тем показана высокая частота PPD-анергии среди больных ФКТ: выявлена подгруппа с низкой пролиферацией на PPD в сочетании со сниженными уровнями секреции IL-2 и IFN γ . У значительной части больных выявлен дефект ответа моноцитов/макрофагов окислительным взрывом на PPD. При этом показана корреляция выраженности окислительного взрыва мононуклеаров больных с уровнями продукции теми же клетками IL-4.

Ключевые слова: туберкулез, анергия, туберкулин, цитокины, мононуклеары.

Kissina T.E., Freidlin I.S., Knoring B.E., Basek T.S., Elkin A.B.

FEATURES OF SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN THE PATIENTS WITH FIBROUS/CAVERNOUS TUBERCULOSIS OF LUNGS

Abstract. The aim of the present study was to determine the different profiles of the immune responsiveness of the patients with fibro-cavernous pulmonary tuberculosis to PPD from *M.tuberculosis* in comparison with their response to standart mitogen and IFN γ . A pronounced specific Th1 response was found, evidenced by the enhanced proliferation and IL-2 and IFN γ production after contact of their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with PPD. At the same time a high frequency of PPD-anergy was shown: considerable proportion of TB patients was characterized by low proliferative response to PPD coupled with the low levels of IL-2 and IFN γ . Most of the patients revealed failure of monocyte/macrophage oxidative burst in response to PPD. Additionally a positive correlation was found between the levels of their PBMC's oxidative burst and IL-4 production. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 501-510)

Введение

Эффективной защите против *M. tuberculosis* способствует адекватная активация иммунитета и развитие клеточного иммунного ответа [4, 25].

Для поддержания устойчивости к инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, необходима продукция ци-

токинов IFN γ и TNF α , вызывающих усиление бактерицидных свойств макрофагов [18, 32]. Продукция провоспалительных цитокинов зависит от способности мононуклеарных клеток адекватно реагировать на антигены *M. tuberculosis*. В связи с этим особое значение при изучении туберкулезной инфекции приобретает оценка особенностей специфического иммунного ответа организма каждого конкретного больного.

При диагностике активного туберкулеза и скрининге латентных случаев инфекции широко используют туберкулиновые кожные пробы. Кожный тест (р. Манту), имеет в своей основе искусственно индуцированную реакцию ГЗТ в ответ на очищенный

Адрес для переписки:

Кисина Татьяна Евгеньевна,
197376, Санкт-Петербург,
ул.Акад.Павлова, д.12.
Тел. (812)234-16-69,
факс (812)234-94-89.
E-mail: tkissina@yandex.ru

белковый антиген микобактерий (PPD или туберкулин). PPD является смесью более чем 200 белков *M. tuberculosis*, многие из которых схожи с белками *M. bovis* *Bacillus Calmette-Guerrin* (BCG) и большинства микобактерий окружающей среды [14, 37]. За счет перекрестной реактивности антигенов, входящих в состав PPD и в состав BCG, кожный тест может оказаться положительным не только у инфицированных туберкулезными микобактериями и больных туберкулезом, но и у здоровых лиц, вакцинированных BCG [15]. Однако оценка степени выраженности туберкулиновой кожной пробы у больных позволяет косвенно судить о напряженности специфического клеточного иммунитета в каждом конкретном случае.

Методами непосредственной оценки выраженности клеточного иммунитета у больных туберкулезом являются тесты, позволяющие *in vitro* оценить ответ Т-лимфоцитов крови на контакт с различными белками микобактерий. Для оценки выраженности ответа Т-лимфоцитов на контакт со специфическими антигенами используют пролиферативный тест, а также количественный анализ продукции лимфоцитами IFN γ [21, 27, 34]. С помощью этих методов был обнаружен феномен анергии у части больных туберкулезом, которая проявляется отсутствием адекватного ответа на контакт со специфическими антигенами. С помощью кожного теста, а затем и другими методами было обнаружено отсутствие ответа на антигены туберкулезных микобактерий у лимфоцитов определенной доли больных. Было показано, что сниженная продукция IFN γ и нарушенная экспрессия костимулирующих молекул у таких больных при контакте со специфическими антигенами являются следствиями ингибирующего влияния IL-10 [12]. Среди 200 больных с легочным туберкулезом были выявлены анергии с отрицательной реакцией на PPD. *In vitro* стимуляция клеток PPD индуцировала продукцию IL-10, IFN γ и пролиферацию у PPD⁺ больных, а у анергиков – продукцию IL-10, но не IFN γ при отсутствии пролиферации. У анергиков конститутивно присутствовали IL-10-продуцирующие клетки [8].

В свете вышеизложенного особое внимание привлекает изучение возможностей некоторых лабораторных тестов для оценки способности клеток крови больных туберкулезом отвечать на микобактериальные антигены.

Материалы и методы

Группы. Было обследовано 49 больных туберкулезом с диагнозом фибрознокавернозный туберкулез (ФКТ). Контрольную группу составили здоровые доноры крови в количестве 31 человека. Больные в момент взятия крови находились на лечении не более 2 недель, до проведения хирургических вмешательств.

Забор крови и выделение мононуклеаров (МНКЛ). Мононуклеары крови выделяли стандартным методом. Доводили концентрацию клеток до 2 млн/мл в полной среде RPMI 1640 («Биолот», Петербург). Содержание моноцитов среди МНКЛ оценивали по поверхностному фенотипу CD14⁺CD45⁺ путем окрашивания соответствующими антителами (BD, США).

Постановка НСТ-теста. Клеточную взвесь мононуклеаров вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (в 6 параллелях для каждого индуктора и контроля), куда заранее были внесены соответствующие объемы индукторов: туберкулин – PPD (НИИ вакцин и сывороток, Петербург в конечной концентрации 10 мкг/мл и рекомбинантный человеческий IFN γ («Ферментас», Вильнюс), в конечной концентрации 500 Ед/мл. В контрольные лунки вносили клеточную взвесь без индукторов. Инкубировали 24 часа при 37°C и 5% CO₂. По окончании инкубации после удаления супернатантов ставили стандартный НСТ-тест [9]. Оценивали ОП при $\lambda=620$ нм. Высчитывали индексы НСТ-теста как отношение ОП в лунках с индуктором к ОП в лунках без индукторов. Рассчитывали доверительные интервалы нормальных значений индексов НСТ-теста при контакте с IFN γ и с PPD в группе доноров ($M \pm SD$).

Постановка пролиферативного теста. С безэритроцитарной лейкоцвезью ставили стандартный пролиферативный тест [1], используя в качестве индуктора туберкулин (PPD) в конечной концентрации 10 мкг/мл, в контрольные лунки вносили взвесь клеток без индукторов, в качестве положительного контроля использовались лунки с ФГА (Sigma, США) в конечной концентрации 40 мкг/мл. Анализировали на проточном цитофлюориметре FACS Calibur (BD, США) в программе CellQuest. Оценка пролиферации с использованием проточного цитофлюориметра заключалась в подсчете процента клеток, связавших удвоенное количество красителя. Выводили доверительный интервал нормальных значений показателей пролиферации в ответ на PPD по группе доноров как $M \pm SD$.

Определение концентраций цитокинов в супернатантах. Уровни IL-2, IL-4, TNF α и IL-10 оценивали одномоментно с использованием проточного цитофлюориметра FACSCalibur, набора BD CBA (США), программ CellQuest и CBA Software 1.3 в соответствии с инструкциями производителя. Уровень IL-10 оценивали также методом ИФА (Biosource, США).

Статистическая обработка. Оценка достоверности различий между изученными показателями у больных туберкулезом легких и здоровых доноров проводилась с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок и точного критерия Фишера. Использовались программы Microsoft

Табл. 1. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ

Показатели	Группа	Процент пролиферирующих клеток при пролиферации		
		спонтанной	в ответ на контакт с ФГА	в ответ на контакт с PPD
Среднее (M) \pm SEM	доноры	1,05 \pm 0,13	24,25 \pm 1,92	2,93 \pm 0,63*
	больные	1,34 \pm 0,23	22,83 \pm 1,62	6,15 \pm 0,81*
разброс	доноры	0,17-2,70	11,00-38,00	0,13-17,00
	больные	0,10-6,10	6,00-42,00	0,30-21,10
SD	доноры	0,69	7,69	3,47
	больные	1,32	9,02	4,75
Доверительный интервал (M \pm SD)	доноры	0,00-1,74	16,56-31,94	0,00-6,40

Примечание: *- различия между группами достоверны при $p < 0,05$

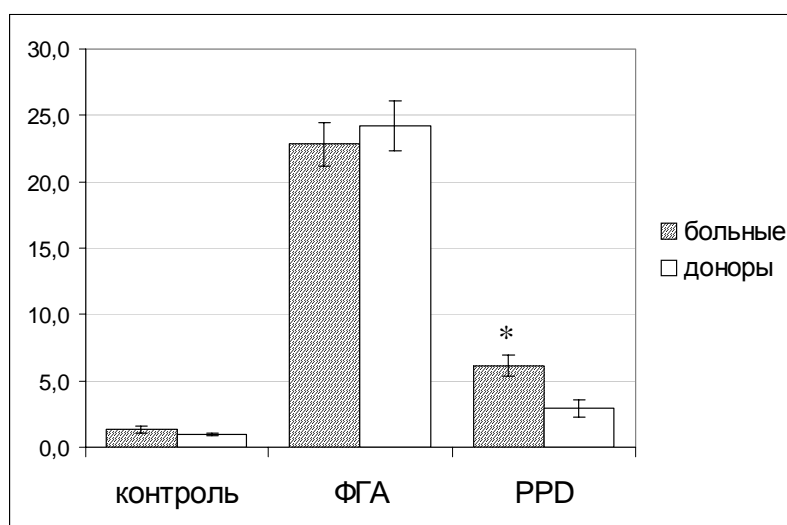


Рис. 1. Процент пролиферирующих мононуклеаров крови доноров и больных туберкулезом при контакте со стандартным митогеном ФГА и специфическими туберкулезными антигенами PPD, M \pm m.

Примечание. *- достоверные различия между группами при $p < 0,05$.

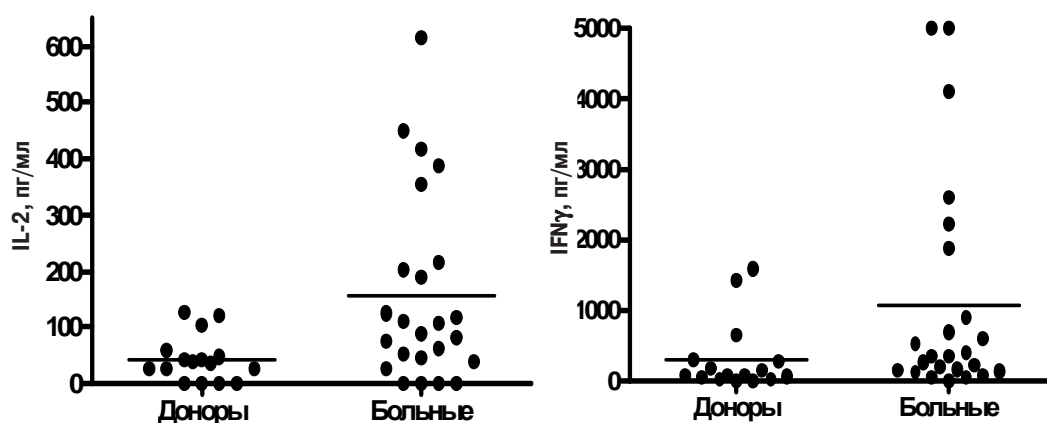


Рис. 2. Уровни цитокинов в надосадках культур мононуклеаров больных ФКТ.

Примечание. Линия - среднее значение

Office Excel 2003, STATISTICA for Windows, Release 5.0. (StatSoft, Inc) и Prism 4.01 (GraphPad Software Inc).

Результаты

Пролиферативная активность лейкоцитов периферической крови. Спонтанный пролиферативный ответ лимфоцитов больных туберкулезом легких в среднем по группе из 34 человек не отличался от такового в группе доноров ($1,34 \pm 0,23$ и $1,05 \pm 0,13$ соответственно, $p=0,26$). По пролиферации лимфоцитов в ответ на неспецифический митоген ФГА больные также не отличались от доноров ($22,8 \pm 1,6$ и $24,2 \pm 1,9$ соответственно, $p=0,58$) (табл.1). В ответ на туберкулин лейкоциты больных ФКТ пролиферировали более активно по сравнению с лейкоцитами доноров, средний процент пролиферирующих клеток после инкубации с туберкулином составил $6,1 \pm 0,8\%$, а у доноров – $2,9 \pm 0,6\%$ ($p<0,01$) (рис.1).

Активность секреции цитокинов лейкоцитами крови. Спонтанная секреция изученных цитокинов лейкоцитами большинства больных не превышала 20 пг/мл и не отличалась от группы доноров. В группе из 24 больных ФКТ легких секреция лейкоцитами периферической крови цитокинов IL-2 ($156,8 \pm 34,2$ пг/мл), IFN γ ($1091,1 \pm 319,4$ пг/мл) в ответ на контакт с PPD была достоверно повышена по сравнению с уровнями секреции тех же цитокинов лейкоцитами крови доноров ($43,8 \pm 10,4$ пг/мл, $p=0,004$ и $313,8 \pm 124,3$ пг/мл, $p=0,031$). Уровень IL-4 у больных ФКТ был также повышен ($901,1 \pm 324,0$ пг/мл) по сравнению с донорами ($250,3 \pm 28,1$ пг/мл, достоверно при $p=0,057$). Средние уровни секреции цитокинов IL-10 и TNF α не отличались от средних уровней секреции клетками доноров (рис.2).

МНКЛ больных в ответ на PPD чаще продуцировали IL-10, чем МНКЛ здоровых доноров (12 из 19 больных против 1 из 15 доноров, $p<0,05$), как было показано методом ИФА.

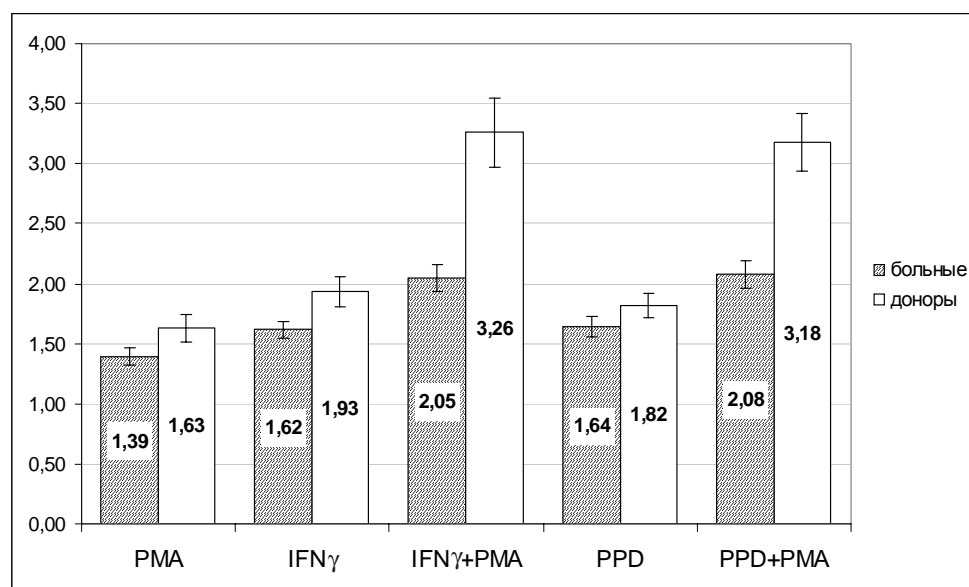


Рис.3. Индексы НСТ-теста в группах больных туберкулезом и доноров при контакте мононуклеаров крови со стандартным индуктором PMA, с цитокином IFN γ и со специфическими туберкулезными антигенами PPD (M \pm m). Примечание. * - достоверные различия между группами при $p<0,05$

Табл. 2. ИНДЕКСЫ НСТ-ТЕСТА В ГРУППЕ ДОНОРОВ

Показатели	Группа	Индексы НСТ в ответ на контакт с:				
		PMA	IFN γ	IFN γ + PMA	PPD	PPD + PMA
Среднее (M) \pm SEM	доноры	$1,63 \pm 0,12$	$1,93 \pm 0,13^*$	$3,26 \pm 0,29^*$	$1,82 \pm 0,10$	$3,18 \pm 0,24^*$
	больные	$1,39 \pm 0,07$	$1,62 \pm 0,07^*$	$2,05 \pm 0,12^*$	$1,64 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,11^*$
SD	доноры	0,57	0,70	1,38	0,57	1,15
	больные	0,46	0,47	0,77	0,56	0,75
разброс	доноры	0,92-3,84	0,85-3,48	1,11-6,37	0,97-3,19	1,34-5,65
	больные	0,71-2,91	0,78-2,89	0,91-4,17	0,59-3,58	0,96-3,59

Примечание: * - различия между группами достоверны при $p<0,05$.

Активность окислительного взрыва мононуклеаров крови в НСТ-тесте. В качестве стандартного активатора окислительного взрыва использовали формбол миристат ацетат (РМА). В качестве индукторов, характерных для туберкулезной инфекции, использовали туберкулин (PPD) и активирующий цитокин IFN γ . В таблице 2 и рис.3 приведены средние индексы НСТ-теста по группам доноров и больных туберкулезом. Мононуклеары больных туберкулезом по способности восстанавливать НСТ в ответ на стандартный индуктор РМА ($1,39 \pm 0,07$) не отличались от клеток доноров ($1,63 \pm 0,12$, $p=0,091$). Туберкулин вызывал несколько слабее выраженный ответ мононуклеаров больных в НСТ-тесте ($1,64 \pm 0,08$) по сравнению с клетками доноров ($1,82 \pm 0,10$, $p=0,171$). В присутствии РМА средний уровень НСТ-теста мононуклеаров больных ($2,08 \pm 0,11$) в ответ на туберкулин был достоверно ниже, чем у доноров ($3,18 \pm 0,24$, $p<0,01$). Индуцированный IFN γ НСТ-тест мононуклеаров больных ($1,62 \pm 0,07$) был несколько ниже, чем у здоровых лиц ($1,93 \pm 0,13$, $p=0,031$). В присутствии РМА НСТ-тест мононуклеаров больных в ответ на IFN γ был достоверно ниже уровня доноров ($2,05 \pm 0,12$ и $3,26 \pm 0,29$ соответственно, $p<0,01$).

Корреляция изученных показателей между собой по всей группе больных ФКТ в сопоставлении с донорами. Уровни секреции цитокинов в группе доноров не коррелировали с уровнями пролиферации моно-

нуклеаров крови в ответ на контакт с PPD. В отличие от этого, в группе больных ФКТ с пролиферацией коррелировали уровни секреции IL-2 ($r=0,42$, $p<0,05$) и TNF α ($r=0,47$, $p<0,05$). При этом отмечена одинаково выраженная прямая корреляция уровней секреции трех цитокинов: IL-2, TNF α и IFN γ как у доноров, так и у больных ФКТ ($r>0,5$, $p<0,05$).

В обеих изученных группах не было обнаружено достоверной корреляции пролиферации и окислительного взрыва МНКЛ в ответ на PPD. Однако показана связь НСТ-теста МНКЛ в ответ на IFN γ и НСТ-теста МНКЛ в ответ на PPD ($r>0,60$, $p<0,05$) как в группе больных, так и в группе доноров.

Обратила на себя внимание корреляция уровней секреции IL-4 с выраженностью окислительного взрыва мононуклеаров больных ФКТ в ответ на контакт с PPD или с IFN γ ($r=0,51$ и $r=0,68$ соответственно, $p<0,05$). Интересно, для группы доноров была характерна обратная связь секреции IL-4 с выраженностью окислительного взрыва мононуклеаров в ответ на PPD ($r=0,55$, $p=0,05$) или IFN γ ($r=0,57$, $p=0,044$).

Выделение и характеристика подгруппы больных ФКТ, лейкоциты которых не отвечали пролиферацией на контакт с PPD. Нами были рассчитаны доверительные интервалы (ДИ) нормальных значений показателей спонтанной пролиферации лейкоцитов крови доноров и пролиферации в ответ на использованные индукторы ($M \pm SD$). Колебания индиви-

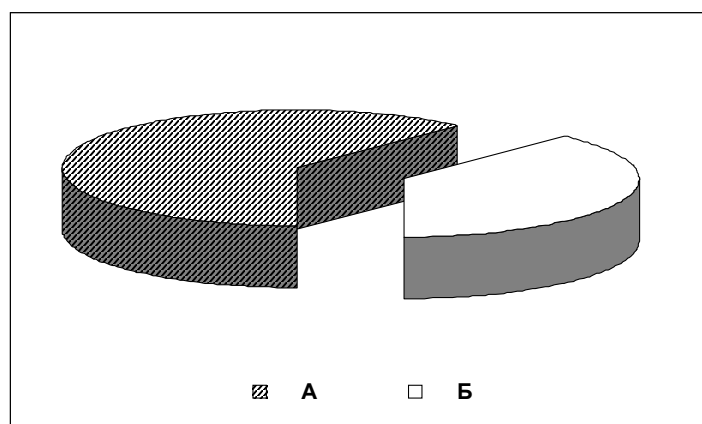


Рис.4. Подгруппы больных туберкулезом: А. - с мононуклеарами, не отвечающими усилением пролиферации на контакт с туберкулином, и Б. - с мононуклеарами крови, отвечающими усилением пролиферации на контакт с туберкулином.

Табл. 3. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В НАДОСАДКАХ КУЛЬТУР МОНОНУКЛЕАРОВ БОЛЬНЫХ ФКТ В ПОДГРУППАХ «А» И «Б» ($M \pm m$, пг/мл)

Подгруппы	Уровни цитокинов				
	IL-2	IL-4	IL-10	TNF α	IFN γ
А	73,9 \pm 17,9*	634,7 \pm 336,7	141,2 \pm 42,2	335,2 \pm 166,7	355,3 \pm 151,0*
Б	272,9 \pm 63,0*	1274,1 \pm 622,9	158,9 \pm 37,0	1046,2 \pm 397,7	2121,5 \pm 614,3*

Примечание: * - различия между группами достоверны при $p<0,05$.

дуальных показателей процента пролиферирующих клеток в пределах ДИ, рассчитанного для доноров, расценивали как отсутствие усиленного пролиферативного ответа. Индивидуальные значения показателей пролиферации, превышающие верхнюю границу ДИ, расценивали как усиленный пролиферативный ответ. По показателям спонтанной пролиферации и пролиферации в ответ на ФГА не было выявлено существенных различий частоты лиц с лейкоцитами, отвечающими пролиферацией, среди доноров и больных ФКТ. Только в случае ответа на контакт с РРД были выявлены статистически достоверные различия частотных показателей: среди доноров отвечающие лейкоциты имели 3 чел. из 30 (10%), а среди больных ФКТ – 13 человек из 34 (38%, $p < 0,05$). При этом выяснилось, что среди обследованных больных ФКТ более чем у половины (62%) лейкоциты крови не отвечали пролиферацией на контакт с РРД (рис. 4). Исходя из этого, мы выделили из группы обследованных больных ФКТ подгруппу «А», включающую лиц (21 чел.), лейкоциты которых не отвечали пролиферацией на контакт с РРД, и провели сопоставление других иммунологических показателей этой подгруппы с подгруппой «Б» больных, лейкоциты которых отвечали пролиферацией на контакт с РРД (13 чел.).

Сопоставление подгрупп «А» и «Б» по уровням секреции цитокинов. Показано, что для МНКЛ больных из подгруппы «А» характерна более низкая продукция IL-2 ($73,9 \pm 17,9$ пг/мл) и IFN γ ($355,3 \pm 151,0$ пг/мл) после стимуляции туберкулином, по сравнению с подгруппой «Б» (соответственно $272,9 \pm 63,0$ пг/мл, $p = 0,01$ и $2121,5 \pm 614,3$ пг/мл, $p = 0,02$) (табл. 3).

При проведении индивидуального сопоставления уровней цитокинов с ДИ, оказалось, что в подгруппе «А» только 36% лиц (5 из 14 человек) характеризовались повышенным уровнем IL-2, тогда как в подгруппе «Б» – 80% (8 из 10 человек; $p = 0,044$). Доля лиц в подгруппе «А» с усиленной продукцией TNF α была также ниже (10%, 2 из 14 человек) чем в подгруппе «Б» (40%, 4 из 10 человек; $p = 0,021$). Аналогично, доля лиц с повышенной продукцией IFN γ в «А»-подгруппе была ниже, чем в «Б»-подгруппе (7% – 1 из 14 человек против 60% – 6 из 10 человек соответственно; $p = 0,003$).

Сопоставление подгрупп «А» и «Б» по НСТ-тесту. Средние индексы НСТ-теста для подгрупп «А» и «Б» достоверно не различались между собой. Для проверки предположения о том, что сниженная пролиферация лейкоцитов больных ФКТ в ответ на туберкулин не ассоциирована со сниженным НСТ-тестом мононуклеаров, индуцированным РРД, провели индивидуальное попарное сопоставление показателей пролиферации и НСТ-теста. При этом оказалось, что у 52% всех обследованных больных ФКТ мононуклеары отвечают на контакт с РРД слабо выраженным окислительным взрывом.

Обсуждение

Решающую роль в защите от туберкулеза играет развитие иммунного ответа по клеточному типу. Специфический иммунный ответ проявляется пролиферацией лимфоцитов и секрецией Th1-цитокинов в ответ на добавление микобактериальных антигенов *in vitro*. Особенностью иммунного ответа при туберкулезе является феномен РРД-анергии, обнаруженный у некоторых больных с отрицательной р. Манту. РРД-анергия проявлялась отсутствием пролиферации лимфоцитов в ответ на туберкулин и его компоненты, а также сниженной продукцией IFN γ в ответ на эти же антигены. Данная работа была посвящена изучению различных проявлений ответа мононуклеаров крови больных туберкулезом при контакте со специфическими антигенами в составе туберкулина, в сопоставлении с ответом тех же клеток на стандартные митогены и на цитокин IFN γ .

Нами были получены данные о неоднородности изученной группы больных туберкулезом по реактивности их лейкоцитов на РРД. Свидетельства подобной гетерогенности больных туберкулезом по способности их клеток реагировать на антигены *M. tuberculosis* были также получены и в других работах [15, 34, 35]. Несмотря на более высокий в среднем процент пролиферации мононуклеаров крови в ответ на РРД по сравнению с донорами, была выявлена подгруппа больных туберкулезом, лейкоциты которых не отвечали выраженной пролиферацией на контакт с РРД. Доля таких лиц составила 62%. По данным литературы, отсутствие выраженной пролиферации в РБТЛ на антигены *M. tuberculosis* характерно для 40-60% больных, среди которых большинство имели отрицательный кожный тест [33]. В работе [28] для больных туберкулезом в среднем был характерен в полтора раза более низкий по сравнению со здоровыми лицами индекс пролиферации в ответ на РРД по оценке включения меченого тимидина. Kumaг и соавт. [20] показали, что среди изученной ими группы больных туберкулезом легких, 67% не отвечали пролиферацией на микобактериальный белок Ара. Нами показано, что для МНКЛ больных с низким пролиферативным ответом на РРД характерна более низкая продукция IL-2 и IFN γ , по сравнению с подгруппой больных с выраженным пролиферативным ответом на туберкулин. Это согласуется с данными других авторов. Shiratsuchi и соавт. [30] сообщают, что низкий пролиферативный ответ на РРД лимфоцитов периферической крови больных распространенными формами туберкулеза вызван нарушением продукции IL-2. Аналогично слабая пролиферативная реакция МНКЛ больных в ответ на РРД была связана с низкой продукцией IL-2 и IFN γ и с повышенной продукцией IL-4 [28]. В работе Magnani и соавт. [22] показано, что CD4⁺ Т-лимфоциты больных туберкулезом с отрицательной р. Манту характеризовались сниженным уровнем

нем продукции $IFN\gamma$ и экспрессии CLA. Известно, что добавление экзогенного IL-2 восстанавливает пролиферативную способность клеток крови [30,3]. МНКЛ больных туберкулезом детей из Эфиопии обладали повышенной PPD-индуцированной продукцией IL-2, так же как и пролиферативной реакцией на PPD [19]. Возможным механизмом нарушения антигенспецифической пролиферации у больных туберкулезом является апоптоз лимфоцитов [2]. Кроме того, в индукции пролиферативной анергии, по-видимому, играют роль регуляторные $CD4^+$ $CD25^+$ T-клетки. Так, у больных хирургическим сепсисом анергия сопровождалась повышенным содержанием этих клеток [3]. Вместе с тем, нами получены данные о сохранении пролиферации клеток больных в ответ на неспецифический митоген ФГА на уровне, характерном для здоровых доноров. Это согласуется с данными литературы о сохранении у больных туберкулезом со сниженной пролиферацией на специфические антигены нормальной пролиферации и продукции $IFN\gamma$ в ответ на ФГА [11, 20, 28].

В качестве эффекторов в специфическом клеточном иммунитете участвуют моноциты/макрофаги (Мн/Мф), которые активируются при контакте с антигенами *M. tuberculosis* и цитокинами Th1-типа. Так как для контроля инфекции *M. tuberculosis* необходима продукция $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, приводящих к активации бактерицидных свойств макрофагов [16], нами показана сильная индуцирующая способность PPD в отношении окислительного взрыва Мн здоровых людей. Многочисленные данные свидетельствуют об активирующих воздействиях микобактерий на функции фагоцитов. В работе на здоровых донорах показано стимулирующее действие PPD на респираторный взрыв нейтрофилов в НСТ-тесте [29]. Опсонизированные сывороткой убитые нагреванием микобактерии индуцировали большой выброс супероксида нейтрофилами [23]. При добавлении в культуру Мф здорового донора нагруженных микобактериями больших доз $IFN\gamma$ вместе с лимфоцитами, праймированными лизатом микобактерий или $IFN\gamma$, происходило уменьшение бактериальной нагрузки (сдерживание роста) за счет бактерицидных свойств активированных Мф [7]. В настоящей работе получены данные о сниженной индукции окислительного взрыва мононуклеаров больных ФКТ в ответ на антиген PPD и специфический для туберкулеза активатор $IFN\gamma$, но не на неспецифический активатор РМА. Доля больных, не отвечающих окислительным взрывом на PPD и $IFN\gamma$ на фоне активатора РМА, составила 52-54%. Особенностью Мн/Мф-ответа при туберкулезе является возможность подавления их функций как самими возбудителями, так и их продуктами. Показано влияние компонента клеточной стенки микобактерий, гликолипида липоарабиноманнана (ЛАМ), на функции

Мн/Мф у здоровых доноров. ЛАМ подавляет функции CR3 на Мф и является сильным индуктором одновременно провоспалительных цитокинов и $TGF\beta$ для моноцитов человека [6]. ЛАМ вирулентных штаммов микобактерий оказывал сильное ингибирующее влияние на микробицидную активность мышиных макрофагов [31]. Фагоцитоз вирулентных штаммов микобактерий, в отличие от авирулентных штаммов, опосредован маннозным рецептором и не приводит ни к активации НАДФН оксидазы, ни к созреванию фагосом [5]. 25 кДа гликопротеин микобактерий подавлял функции макрофагов, полученных из РВМС: продукцию лизоцима, активацию гексозомонофосфатного шунта, внеклеточную продукцию перекиси и способность восстанавливать НСТ. Эти эффекты отменялись в присутствии $IFN\gamma$ [36]. Сульфатид, основной компонент наружного липидного слоя микобактериальной мембраны, отменял праймирующее действие многих известных макрофагальных активаторов, среди которых $IFN\gamma$, IL-1 β , $TNF\alpha$, ЛПС и мурамилдипептид, в отношении продукции супероксида за счет косвенного подавления активности протеин киназы C [10]. Показано подавление 19 кДа липопротеином и самой *M. tuberculosis* экспрессии 40% генов, индуцированных $IFN\gamma$ в макрофагах мыши [26].

Нами не было обнаружено достоверной взаимосвязи результатов двух тестов: пролиферации и окислительного взрыва МНКЛ в ответ на PPD. При этом для части больных (треть) было характерно сочетанное нарушение пролиферативной функции лимфоцитов и окислительного взрыва мононуклеаров. По данным литературы, пациенты со сниженной ГЗТ на туберкулин в кожном тесте в большинстве случаев обладают и другими дефектами иммунного ответа на специфические антигены: слабой пролиферативной реакцией, низкими уровнями продукции IL-2 и $IFN\gamma$ в ответ на PPD [11, 28, 29]. С другой стороны, было показано отсутствие связи кожной реакции на PPD с уровнем антиген-стимулированной продукции $IFN\gamma$ у здоровых людей [17] и больных туберкулезом [35]. В работе Magnani и соавт. [22] показано, что $CD4^+$ Т лимфоциты больных туберкулезом с отрицательной р.Манту пролиферировали и продуцировали IL-2 так же эффективно, как и клетки остальных больных. В настоящем исследовании обнаружена корреляция уровней секреции IL-4 с выраженностью окислительного взрыва мононуклеаров больных ФКТ в ответ на контакт с PPD или с $IFN\gamma$. Это укладывается в концепцию о трех путях активации Мн/Мф [13, 24]. Так, помимо классической активации Мн/Мф при участии $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ с образованием эффекторных клеток Th1-ответа, существуют еще альтернативная активация и недавно описанная активация 2 типа. Альтернативная активация Мн/Мф, происходящая в присутствии IL-4 и глюкокортикоидов, играет роль в иммуносупрессии и репа-

рации тканей. Мн/Мф, активированные по 2 типу в присутствии IL-4, обладают некоторыми противовоспалительными свойствами, способствуя Th2-ответу. При этом в Мф происходит образование активных форм кислорода, как при классической активации. Возможно, связь НСТ-теста с IL-4 (а не IFN γ) может быть следствием активации Мф по 2 типу.

При изучении группы больных ФКТ нами выявлено формирование выраженного клеточного специфического ответа, о чем свидетельствует повышенная по сравнению с донорами пролиферация мононуклеаров крови в ответ на PPD в сочетании с усиленной секрецией IL-2 и IFN γ в ответ на PPD. Среди этих больных выявлена подгруппа, составляющая более половины всех больных, в которой пролиферативный ответ на PPD не выходил за пределы донорской нормы. У них же были снижены уровни секреции IL-2 и IFN γ . Это наблюдение позволяет сделать заключение о высокой частоте среди больных ФКТ анергии, судя по отсутствию пролиферативного ответа и секреции цитокинов в ответ на PPD. У трети больных дополнительно выявлены дефекты окислительного взрыва мононуклеаров в ответ на контакт с PPD, судя по сниженным показателям НСТ-теста. Выявленная прямая корреляция уровня секреции IL-4 с выраженностью НСТ-теста в ответ на PPD или IFN γ может свидетельствовать об активации Мн/Мф по 2-типу у части больных туберкулезом.

Список литературы

1. Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В., Климова С.В., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Бахус Г.О. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека // Пособие для врачей-лаборантов.- Москва, 2001.- С. 53.
2. Хонина Н.А, Сахно Л.В., Норкин М.Н., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д., Огиренко А.П., Останин А.А., Черных Е.Р. Апоптоз лимфоцитов как возможный механизм нарушения антиген-специфического ответа при туберкулезе легких // Медицинская иммунология. - 2001. - Т.3, №1. - С.51-59.
3. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Сахно Л.В. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в развитии иммунной недостаточности при инфекционно-воспалительных и онкологических заболеваниях // Медицинская иммунология. - 2003. - Т. 5, № 3-4. - С.365-366.
4. Abehsira-Amar O., Gibert M., Jolij M., Theze J., and Jankovic D. L. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells // J. Immunol. - 1992. - Vol. 148.- P.3820-3829.
5. Astarie-Dequeker C., N'Diaye E.-N., Cabec V., Rittig M. G., Prandi J. and Maridonneau-Parini I. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages // Infection And Immunity. - 1999.- Vol. 67, No. 2. - P.469-477.
6. Bernardo J., Billingslea A. M., Blumenthal R. L., Seetoo K. F., Simons E. R., and Fenton M. J.. Differential Responses of Human Mononuclear Phagocytes to Mycobacterial Lipoarabinomannans: Role of CD14 and the Mannose Receptor // Infection And Immunity. - 1998. - Vol.66. - P.28 - 35
7. Bonecini-Almeida M.G., Chitale S., Boutsikakis I., Geng J., Doo H., He S., Ho J.L. Induction of *in vitro* human macrophage anti-Mycobacterium tuberculosis activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes // J Immunol. - 1998. - Vol.160, №9. - P.4490-4499.
8. Boussiotis V., Tsai E., Yunis E., Thim S., Delgado J., Dascher Ch., Berezovskaya A., Roussier D., Reynes J., Goldfeld A. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients // J. Clinical Invest. - 2000.- Vol.105. - P.1317-1324.
9. Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field // Scand. Journal Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol.97. - P.51-76
10. Brozna J. P., Horan M., Rademacher J. M., Pabst K. M., Pabst M. J. Monocyte responses to sulfatide from mycobacterium tuberculosis: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation // Infection And Immunity. - 1991. - Vol. 59, No. 8. - P.2542-2548
11. Delgado J. C., Tsai E.Y., Thim S. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia // PNAS. - 2002. - Vol.99, №11. - P.7576-7581
12. Gong J.-H., Zhang M., Modlin R. L., Linsley P. S., Iyer D., Lin Y., Barnes P.F. Interleukin-10 Downregulates Mycobacterium tuberculosis-Induced Th1 Responses and CTLA-4 Expression // Infection And Immunity. - 1996. - Vol. 64, No. 3.- P.913-918
13. Gordon S. Alternative activation of macrophages // Nat Rev Immunol. - 2003. - Vol.3, №1. - P.23-35.
14. Jasmer R. M., Nahid P., and Hopewell P. C. Clinical practice. Latent tuberculosis infection // N. Engl. J. Med. - 2002. - Vol.347. - P.1860-1866.
15. Johnson P. D. R., Stuart R. L., Grayson M. L., Olden D., Clancy A., Ravn P., Andersen P., Britton W. J., and Rothel J. S.. Tuberculin-Purified Protein Derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-Stimulated Gamma Interferon Responses in Medical Students before and after Mycobacterium bovis BCG Vaccination and in Patients with Tuberculosis // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. - 1999. - Vol.6, No.6. - P.934-937.

16. Kagaya K., Watanabe K., Fukazawa Y. Capacity of Recombinant Gamma Interferon To Activate Macrophages for Salmonella-Killing Activity // *Infection And Immunity*. - 1989. - P.609-615.
17. Katial R. K., Hershey J., Purohit-Seth T., Belisle J. T., Brennan P. J., Spencer J. S., and Engler R. J. M. Cell-Mediated Immune Response to Tuberculosis Antigens: Comparison of Skin Testing and Measurement of *In vitro* Gamma Interferon Production in Whole-Blood Culture // *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*. - 2001. - Vol.8, No. 2. - P.339-345.
18. Kindler V., Sappino A.P., Grau G.E., Piguet P.F., Via L.E., Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection // *Cell*. - 1989. - Vol.56. - P.731-740.
19. Kori M., Barak V., Leibovitz E., Altman Y., Eliraz A., Handzel Z.T. Specific *in vitro* proliferative immune responses and lymphokine production in Ethiopian children with and without tuberculosis // *Infection*. - 2000. - Vol.28, №1. - P.42-45.
20. Kumar P., Amara R. R., Challu V. K., and Satchidanandam V. The Apa Protein of Mycobacterium tuberculosis Stimulates Gamma Interferon-Secreting CD4 and CD8 T Cells from Purified Protein Derivative-Positive Individuals and Affords Protection in a Guinea Pig Model // *Infection And Immunity*. - 2003. - Vol. 71, No. 4. - p.1929-1937.
21. Liu X., Dosanjh D., Varia H., Ewer K., Cockle P., Pasvol G., and Lalvani A. Evaluation of T-Cell Responses to Novel RD1- and RD2-Encoded Mycobacterium tuberculosis Gene Products for Specific Detection of Human Tuberculosis Infection // *Infection and Immunity*. - 2004. - Vol.72, No.5. - P.2574-2581.
22. Magnani Z. I., Confetti C., Besozzi G., Codecasa L. R., Panina-Bordignon P., Lang R., Rossi G. A., Pardi R., and Burastero S. E. Circulating Mycobacterium tuberculosis-specific lymphocytes from PPD skin test negative patients with tuberculosis do not secrete interferon-gamma and lack the cutaneous lymphocyte antigen skin-selective homing receptor // *Clin. Exp. Immunol*. - 2000. - Vol.119. - P.99-106.
23. May M.E. and Spagnuolo P.J. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium tuberculosis // *Infect. Immun*. - 1987. - Vol.55, №9. - P.2304-2307.
24. Mosser D. M. The many faces of macrophage activation // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2003. - Vol.73. - P.209-212.
25. Orme I. M., Roberts A. D., Griffin J. P., and Abrams J. S. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection // *J. Immunol*. - 1993. - Vol.151. - P.518-525.
26. Pai R.K., Pennini M.E., Tobian A.A., Canaday D.H., Boom W.H., Harding C.V. Prolonged toll-like receptor signaling by Mycobacterium tuberculosis and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages // *Infect Immun*. - 2004. - Vol.72, №11. - P.6603-6614.
27. Portales-Perez D.P., Baranda L., Layseca E., Fierro N.A., Fuente H., Rosenstein Y., Gonzalez-Amaro R. Comparative and Prospective Study of Different Immune Parameters in Healthy Subjects at Risk for Tuberculosis and in Tuberculosis Patients // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. - 2002. - Vol.9, No.2. - P.299-307.
28. Sanchez F.O., Rodriguez J.I., Agudelo G., Garcia L.F. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls // *Infect Immun*. - 1994. - Vol.62, №12. - P.5673-5678.
29. Senyk G., Hadley W. K. *In vitro* Correlates of Delayed Hypersensitivity in Man: Ambiguity of Polymorphonuclear Neutrophils as Indicator Cells in Leukocyte Migration Test // *Infection and Immunity*. - 1973. - Vol.8, No.3. - P.370-380.
30. Shiratsuchi H., Okuda Y., and Tsuyuguchi I. Recombinant Human Interleukin-2 Reverses *In vitro*-Deficient Cell-Mediated Immune Responses to Tuberculin Purified Protein Derivative by Lymphocytes of Tuberculosis Patients // *Infection And Immunity*. - 1987. - Vol.55, No.9. - P.2126-2131.
31. Sibley L.D., Hunter S.W., Brennan P.J., and Krahenbuhl J.L. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages // *Infect. Immun*. - 1988. - Vol.56, №5. - P.1232-1236.
32. Smith S., Liggitt D., Jeromsky E., Tan X., Skerrett S.J., Wilson C.B. A local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to Mycobacterium tuberculosis infection // *Infect Immun*. - 2002. - Vol.70. - P.2082-2089.
33. Toossi Z., Ellner J.J. Mechanisms of anergy in tuberculosis // *Curr Top Microbiol Immunol*. - 1996. - Vol.215. - P.221-238.
34. Ulrichs T., Anding P., Porcelli S., Kaufmann S. H. E., and Munk M. E. Increased Numbers of ESAT-6- and Purified Protein Derivative-Specific Gamma Interferon-Producing Cells in Subclinical and Active Tuberculosis Infection // *Infection And Immunity*. - 2000. - Vol. 68, No. 10. - P.6073-6076.
35. Vekemans J., Lienhardt C., Sillah J.S., Wheeler J.G., Lahai G.P., Doherty M.T., Corrah T., Andersen P., Mcadam W. J., Marchant A. Tuberculosis Contacts but Not Patients Have Higher Gamma Interferon Responses to ESAT-6 than Do Community Controls in The Gambia // *Infection And Immunity*. - 2001. - Vol.69, No.10. - P.6554-6557.
36. Wadee A.A. and Clara A.M. A 25-Kilodalton Fraction from Mycobacterium tuberculosis That Inhibits Hexose Monophosphate Shunt Activity, Lysozyme Release, and H2O2 Production: Reversal by Gamma Interferon // *Infection And Immunity*. - 1989. - P.864-869.
37. Weir R.E., Fine P.E., Nazareth B., Floyd S., Black G.F., King E., Stanley C., Bliss L., Bran-

son K., and Dockrell H.M. Interferon-gamma and skin test responses of schoolchildren in southeast England to purified protein derivatives from *Mycobac-*

terium tuberculosis and other species of mycobacteria // Clin Exp Immunol. - 2003. - Vol.134, №2. - P.285-294.

поступила в редакцию 13.05.2006

принята к печати 17.06.06