

РЕАКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Хасанова Р.Р., Воронкова О.В., Уразова О.И.,
Новицкий В.В., Стрелис А.К., Стамбула Ю.В.,
Колосова А.Е., Серебрякова В.А., Наследникова И.О.,
Колоколова О.В., Будкина Т.Е., Пирогова Н.П.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск

Резюме. С использованием культуральных методов проводили оценку пролиферативной и IL-2-продуцирующей активности лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым инфильтративным туберкулезом легких на базальном уровне и при стимуляции рекомбинантным IL-2 и антигенами *M. tuberculosis*. Установлено, что течение инфильтративного туберкулеза легких вне зависимости от лекарственной чувствительности/резистентности возбудителя инфекции сопровождается угнетением реакции спонтанной лимфопролиферации. Уровень стимулированной продукции IL-2 при лекарственно-чувствительном варианте туберкулеза выше, а резерв IL-2-секретирующей реактивности лимфоцитов крови, напротив, ниже, чем при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких. Обнаружено также, что уровень лимфопролиферативного ответа при действии рекомбинантного IL-2 не зависит от варианта туберкулезного процесса, в то время как стимуляция продукции эндогенного IL-2 лимфоцитами крови достигается только при лекарственно-устойчивом его варианте.

Ключевые слова: туберкулез легких, антигены, лимфоциты, цитокины, реактивность.

Khasanova R.R., Voronkova O.V., Urazova O.I., Novitsky V.V., Strelis A.K., Stambula Yu.V., Kolosova A.E., Serebryakova V.A., Naslednikova I.O., Kolokolova O.V., Budkina T.E., Pirogova N.P.

REACTIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTES IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Abstract. Evaluation of proliferative and IL-2-producing activity of peripheral blood lymphocytes was performed, using cultural methods, in patients with drug-sensitive and drug-resistant infiltrative pulmonary tuberculosis. The cell testing was performed at basal level and following *in vitro* stimulation with recombinant IL-2 and *M. tuberculosis* antigens. It was established that clinical course of infiltrative pulmonary tuberculosis, independently on drug sensitivity/resistance of the infectious pathogen, is accompanied by suppression of spontaneous lymphoproliferation. The levels of induced IL-2 production in drug-sensitive tuberculosis proved to be increased, whereas a reserve of IL-2-secreting reactivity of blood lymphocytes was lower than in drug-resistant infection. Also, it was revealed that the level of lymphoproliferative response induced by IL-2, does not depend on clinical variant of tuberculosis, whereas stimulation of IL-2 production in blood lymphocytes is attained only in cases of drug-resistant tuberculosis variant. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 35-40)

Введение

Туберкулез занимает одну из ведущих позиций среди наиболее распространенных инфекционных заболеваний [1, 3, 4, 5]. Основным звеном противоинфекционной защиты при туберкулез-

ной инфекции, как известно, является Т-система иммунитета. Снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в ответ на неспецифические и специфические стимулы рассматривается как критерий вторичного иммунодефицита, который может развиваться при туберкулезе легких вследствие действия инфектогена [2, 4, 6, 7, 8].

Целью настоящего исследования являлась оценка реактивности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких в ответ на действие различных антигенов *M. tuberculosis*.

Адрес для переписки:

Хасанова Резеда Рахматулловна
634049, г. Томск, ул. Иркутский тракт, 17, кв. 341.
Тел.: (3822) 753-603.
E-mail: Hasanova_Rezeda@mail.ru

Материалы и методы

Под наблюдением находились 30 впервые выявленных больных (16 мужчин и 14 женщин) с инфильтративным туберкулезом легких (ТЛ) в возрасте от 18 до 55 лет. Диагноз туберкулеза легких устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

Были сформированы две группы обследованных лиц: первую группу составили 15 пациентов, выделяющих *M. tuberculosis*, чувствительные к основным противотуберкулезным препаратам, во вторую группу вошли 15 больных, выделяющих *M. tuberculosis* с первичной множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) одновременно к изониазиду, рифампицину и стрептомицину. Группу сравнения составили 10 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, не имеющих в анамнезе хронических инфекционных заболеваний, аллергических реакций, заболеваемость острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями которых составляла не чаще 3–4 раз в год.

Материалом исследования служили лимфоциты периферической крови. Выделение лимфоцитов из цельной крови осуществляли методом градиентного центрифугирования с фиколлурографинном ($\rho = 1077 \text{ кг/м}^3$). Культивирование лимфоцитов проводили в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, 2 мМ/мл HEPES. Количество клеток в суспензии стандартизировали до $2,5 \times 10^6/\text{мл}$. Для стимуляции пролиферации лимфоцитов в пробы вносили комплексные белковый и липидный антигены, выделенные из *M. tuberculosis*, принадлежащих к семейству Beijing¹, в дозе 20 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно, рекомбинантный IL-2 («Biosource», USA) в дозе 5 нг/мл, вакцинный штамм БЦЖ в дозе 50 мкг/мл. Для определения уровня IL-2 в суточных супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Пролиферативную активность лимфоцитов крови оценивали по методу, основанному на изменении цвета связывающегося с клетками красителя 3-[4,5,-диметилтиазолил-2]-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ, тиазолил синий) из синего в желтый. Для оценки резервной способности клеток рассчитывали индекс стимуляции, представляющий собой коэффициент, равный отношению соответствующего

¹ Антигены предоставлены иммунологической лабораторией института инфекционной биологии им. Макса Планка (г. Берлин).

показателя на базальном уровне (без стимуляции) к параметру, полученному при использовании индуктора. Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты

При анализе пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких нами не было обнаружено статистически значимых различий исследуемых параметров в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный и лекарственно-резистентный), поэтому мы сочли возможным объединить данные, полученные у пациентов обеих групп исследования. В целом нами было выявлено снижение спонтанной пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров (табл. 1). Стимуляция клеточных культур липидным антигеном *M. tuberculosis* приводила к усилению (относительно спонтанной) пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких в среднем в 1,6 раза, при этом достоверных различий в реакции бласттрансформации, стимулированной липидным антигеном, по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров выявлено не было (табл. 1).

При воздействии белковым антигеном *M. tuberculosis* на лимфоцитарные клетки периферической крови при туберкулезе легких отмечалось статистически значимое усиление пролиферативной активности лимфоцитов относительно базальной. Однако при данном виде стимуляции уровень пролиферации клеток у больных туберкулезом оказался достоверно ниже соответствующих значений у здоровых доноров в среднем на 15% (табл. 1).

При стимуляции клеточных культур рекомбинантным IL-2 у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких происходило в одинаковой степени выраженное усиление (относительно спонтанной) пролиферативной активности клеток в среднем в 1,5 раза (табл. 1), равно как и при добавлении в клеточные культуры вакцинного штамма микобактерий (БЦЖ). При этом IL-2-индуцированный пролиферативный ответ лимфоцитов достоверно превышал уровень спонтанной лимфопролиферации как у здоровых доноров, так и у пациентов с туберкулезной инфекцией (табл. 1).

Таким образом, при изучении резервных возможностей лимфоцитов периферической крови к усилению пролиферативной активности на фоне индуцирующего антигенного и ци-

ТАБЛИЦА 1. ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, $M \pm m$

Пролиферативная активность, ед. опт. пл.		Группы обследованных лиц	
		Здоровые доноры	Больные ТЛ
Спонтанная (базальная)		0,254±0,010	0,214±0,010 $p_1 = 0,015$
При действии стимуляторов	Белковый антиген <i>M. tuberculosis</i>	0,380±0,028 $p_2 = 0,027$	0,319±0,017 $p_1 = 0,032$ $p_2 < 0,001$
	Липидный антиген <i>M. tuberculosis</i>	0,348±0,010 $p_2 = 0,046$	0,346±0,021 $p_2 < 0,001$
	Рекомбинантный IL-2	0,355±0,031 $p_2 = 0,027$	0,329±0,017 $p_2 < 0,001$
	Вакцинный штамм (БЦЖ)	0,376±0,017 $p_2 = 0,027$	0,387±0,030 $p_2 < 0,001$

Примечание. Здесь и в таблице 2: IL-2 – интерлейкин 2; ТЛ – туберкулез легких; p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p_2 – по сравнению со спонтанной пролиферативной активностью.

токинового воздействия мы зарегистрировали достоверное увеличение индекса стимуляции лимфопротерации (для липидного антигена *M. tuberculosis*, рекомбинантного IL-2, вакцинного штамма БЦЖ) у больных туберкулезом легких по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров (табл. 2).

В ходе проведенных исследований было зарегистрировано изменение (относительно параметров у здоровых доноров) уровня базальной продукции IL-2, который оказался достоверно ниже при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких (ЛУТЛ) и, напротив, увеличивался в среднем на 25% при лекарственно-чувствительном варианте туберкулеза легких (ЛЧТЛ) (табл. 3).

Стимуляция лимфоцитарных клеток белковым микобактериальным антигеном у больных ЛУТЛ вызывала значимое усиление продукции IL-2, в то время как у здоровых доноров и больных ЛЧТЛ она практически не изменялась по сравнению со значениями спонтанной секреции цитокина (табл. 3).

Добавление в клеточные культуры липидного антигена *M. tuberculosis* приводило к усилению выработки IL-2 лимфоцитами периферической крови только при ЛЧТЛ, которая превышала значения контроля и у больных ЛУТЛ в среднем в 2 раза (табл. 3).

При воздействии рекомбинантным IL-2 на лимфоцитарные клетки *in vitro* нами было зарегистрировано достоверное увеличение продукции эндогенного IL-2 у больных ЛУТЛ как относительно базального уровня, так и по сравнению с нормой. В группе больных с ЛЧТЛ, напротив, уровень IL-2 в супернатантах культуральных суспензий оказался ниже такового в культурах без стимуляции (базальный уровень) и у пациентов с ЛУТЛ, но превышал соответствующие значения у здоровых доноров (табл. 3).

Действие вакцинного штамма (БЦЖ) на клеточные культуры оказалось односторонним во всех трех группах обследованных лиц и вызывало значимое усиление наработки эндогенного IL-2 приблизительно в 2 раза относительно базальной его продукции. При этом при ЛУТЛ

ТАБЛИЦА 2. РЕЗЕРВ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, $M \pm m$

Индексы стимуляции лимфопротерации	Группы обследованных лиц	
	Здоровые доноры	Больные ТЛ
Для белкового антигена <i>M. tuberculosis</i>	1,402±0,129	1,527±0,077
Для липидного антигена <i>M. tuberculosis</i>	1,288±0,085	1,725±0,139 $p_1 = 0,042$
Для рекомбинантного IL-2	1,289±0,081	1,584±0,095 $p_1 = 0,049$
Для вакцинного штамма (БЦЖ)	1,384±0,094	1,933±0,184 $p_1 = 0,042$

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ IL-2 ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, $M \pm m$

Концентрация IL-2 (пг/мл)		Группы обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные ТЛ	
При действии стимуляторов			ЛУТЛ	ЛЧТЛ
	Спонтанная (базальная)	9,186±0,746	6,732±0,403 $p_1 = 0,048$	11,793±0,379 $p_1 = 0,039$ $p_3 = 0,002$
	Белковый антиген <i>M. tuberculosis</i>	10,412±0,845	10,097±0,819 $p_2 = 0,011$	11,652±0,946
	Липидный антиген <i>M. tuberculosis</i>	7,021±0,021 $p_2 = 0,038$	7,511±0,022	14,893±0,775 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,028$ $p_3 = 0,004$
	Рекомбинантный IL-2	7,30±0,593 $p_2 = 0,048$	16,721±1,358 $p_1 = 0,03$ $p_2 = 0,04$	9,722±0,789 $p_1 = 0,049$ $p_3 = 0,034$
	Вакцинный штамм (БЦЖ)	15,565±1,264 $p_2 = 0,046$	15,935±0,593 $p_2 = 0,028$	21,5±0,09 $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,028$ $p_3 = 0,004$

Примечание. IL-2 – интерлейкин 2; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких; ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ТЛ – туберкулез легких; p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p_2 – по сравнению со спонтанной пролиферативной активностью; p_3 – по сравнению с соответствующими параметрами у больных ЛУТЛ ($p < 0,05$).

существенных различий по сравнению с нормой выявлено не было, в то время как у больных с ЛЧТЛ уровень БЦЖ-активированной секреции IL-2 оказался выше такового не только у здоровых доноров, но и при ЛУТЛ (в 1,3 раза, табл. 3).

Оценивая резервные возможности лимфоцитов периферической крови к продукции IL-2 в ответ на действие различных стимуляторов, нами было отмечено, что при ЛУТЛ индекс стимуляции, представляющий собой отношение

значения для антиген-индуцированной выработки цитокина к уровню его базальной секреции, выработки данного цитокина оказался значимо выше нормы при воздействии на клетки крови в культуре белковым микобактериальным антигеном, вакцинным штаммом БЦЖ и особенно рекомбинантным IL-2. При ЛЧТЛ достоверное увеличение (по сравнению с таковым у здоровых доноров) индекса стимуляции обнаруживалось только при активации клеток липидным антиге-

ТАБЛИЦА 4. РЕЗЕРВ IL-2-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, $M \pm m$

Индексы стимуляции выработки IL-2	Группы обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Больные ТЛ	
		ЛУТЛ	ЛЧТЛ
Для белкового антигена <i>M. tuberculosis</i>	1,101±0,089	1,473±0,094 $p_1 = 0,038$	0,974±0,079 $p_2 = 0,038$
Для липидного антигена <i>M. tuberculosis</i>	0,862±0,070	1,151±0,074	1,259±0,033 $p_1 = 0,010$
Для рекомбинантного IL-2	0,816±0,066	2,533±0,206 $p_1 = 0,009$	0,828±0,067 $p_2 = 0,038$
Для вакцинного штамма (БЦЖ)	1,933±0,157	2,438±0,165 $p_1 = 0,047$	1,832±0,057 $p_2 = 0,025$

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p_2 – по сравнению с соответствующими параметрами у больных ЛУТЛ ($p < 0,05$).

ном, при этом на фоне воздействия других стимуляторов он оказался ниже, чем в группе больных ЛУТЛ (табл. 4).

Обсуждение

Как известно из литературы, состояние иммунитета больных прогрессирующим ТЛ характеризуется угнетением клеточного звена: уменьшением количества активных жизнеспособных Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$), угнетением их пролиферативной и функциональной активности, склонностью лимфоцитов к активационно-индуцированному апоптозу, и, напротив, сопровождается подъемом уровня иммуноглобулинов и высокими титрами противотуберкулезных антител [2, 3, 5]. В результате проведенных нами исследований мы зарегистрировали снижение спонтанной пролиферативной активности лимфоцитов относительно параметров у здоровых доноров, что в целом соответствует данным литературы: многие авторы указывают на аналогичные изменения и связывают их с анергией Т-лимфоцитов [6]. Среди причин, объясняющих снижение пролиферативного ответа лимфоцитов, мы могли бы выделить следующие: низкая экспрессия мембранных рецепторных белков, которые обеспечивают передачу внеклеточного сигнала к активации, недостаточность активирующего сигнала (низкий уровень активирующих цитокинов либо гиперпродукция ингибирующих цитокинов регуляторными клетками в результате медиаторного дисбаланса между Th1 и Th2 лимфоцитами), блок трансдукции сигнала от мембраны к ядру клетки, и, наконец, метаболическое истощение последней. Кроме того, как утверждают многие авторы, феномен угнетения антиген-специфического ответа *in vitro* может обсуждаться в контексте механизмов ускользания *M. tuberculosis* от иммунного ответа, т.е. непосредственного и опосредованного влияния возбудителя на лимфоциты [3, 8, 9]. Оценивая индексы стимуляции пролиферативной функции лимфоцитов для каждого использованного индуктора, нами было отмечено, что лимфоциты у больных ТЛ независимо от его клинического варианта сохраняют резервные возможности к усилению пролиферации в ответ на стимуляцию, за исключением пролиферативного ответа на действие белковым микобактериальным антигеном, который оказался достоверно ниже, чем у здоровых доноров. Как известно, белковые компоненты функционируют в составе клеточной стенки микобактерий, однако в связи с тем, что их свойства мало изучены, можно предположить, что данный антиген является более слабым активатором Т-клеток, чем липидный, а соответственно, необходимы более высокие его дозы для усиления пролиферативной

активности лимфоцитов *in vitro*. При стимуляции клеточных культур лимфоцитов рекомбинантным IL-2 и вакцинным штаммом БЦЖ у больных ТЛ наблюдалось усиление (по сравнению с базальной) пролиферативной активности лимфоцитов в среднем на 15%, что, на наш взгляд, может служить косвенным признаком анергии Т-лимфоцитов — так называемой временной иммунологической толерантности в ответ на туберкулезную инфекцию.

Выводы

1. Течение инфильтративного туберкулеза легких сопровождается угнетением реакции спонтанной лимфопротиферации. При этом уровень базальной продукции IL-2 лимфоцитами крови при ЛЧТЛ выше, а при ЛУТЛ ниже, чем у здоровых доноров.

2. Увеличение резерва пролиферативной реактивности лимфоцитарных клеток, стимулированных рекомбинантным IL-2, липидным антигеном и вакцинным штаммом *M. tuberculosis*, при туберкулезе легких сочетается со слабой реакцией лимфопротиферации в ответ на белковый микобактериальный антиген.

3. Уровень стимулированной продукции IL-2 при ЛЧТЛ выше, а резерв IL-2-секретирующей реактивности лимфоцитов крови, напротив, ниже, чем при ЛУТЛ.

4. Реакция лимфоцитов на антигены *M. tuberculosis* генотипа Beijing определяется вариантом заболевания (положительная на белковый и отрицательная на липидный антигены при ЛУТЛ и с противоположным характером — при ЛЧТЛ).

5. При действии рекомбинантного IL-2 уровень лимфопротиферативного ответа не зависит от варианта туберкулезного процесса, в то время как стимуляция продукции эндогенного IL-2 лимфоцитами крови достигается только при ЛУТЛ.

Исследования проведены при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (государственные контракты № 02.512.11.2040 и № 02.512.11.2112), Совета по грантам при Президенте РФ (№ МД-3659.2007.7).

Список литературы

1. Кноринг Б.Е., Симбирцев А.С., Сахарова И.Я. Изменения в продукции IL-1 β , ФНО α и IL-2 в зависимости от состояния иммунитета у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 1999. — Т. 8, № 4. — С. 31-35.

2. Мишин В.Ю., Степанян И.Э. Контролируемая химиотерапия туберкулеза органов дыхания в современных условиях. Проблема лекарственной устойчивости // Русский медицинский журнал. — 2000. — С. 496-500.

3. Мишин В.Ю., Чуканов В.И., Васильева И.А. Эффективность лечения туберкулеза легких, вызванного микобактериями с множественной лекарственной устойчивостью // Проблемы туберкулеза. — 2002. — № 12. — С. 18-21.

4. Салина Т.Ю., Худзик Л.Б. Иммунопатогенетические механизмы в течении туберкулезной инфекции // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2001. — № 8. — С. 32-34.

5. Фрейдлин И.С. Ключевая позиция макрофагов в цитокиновой регуляторной сети // Иммунология. — 1995. — № 3. — С. 44-48.

6. Хонина Н.А., Никонов С.Д., Шпилевский С.В., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Особенности

иммунитета у больных с различными формами туберкулеза легких // Проблемы туберкулеза. — 2000. — № 1. — С. 30-34.

7. Чуканов В.И., Кузьмина Н.В. Состояние иммунитета у больных туберкулезом легких, выделяющих лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 1999. — № 1. — С. 17-19.

8. Rouse D.A., Morris S.L. Molecular mechanisms of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis and mycobacterium bovis // Infect. Immun. — 1995. — Vol. 63, N 4. — P. 1427-1433.

9. Trueblood E.S., Brown W.C., Palmer G.H. B-Lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2 // J. Virol. — 1998. — Vol. 72, N 4. — P. 3169-3177.

поступила в редакцию 26.08.2008

принята к печати 04.09.2008