

## Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью

Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Воронкова О.В., Колобовникова Ю.В.

## Subpopulation structure of regulatory T-cells of blood in patients with multiple drugresistant pulmonary tuberculosis

Churina Ye.G., Novitsky V.V., Urazova O.I., Voronkova O.V., Kolobovnikova Yu.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др.

Проанализирован субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток (Т-рег) периферической крови у больных с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам. Показано, что ведущую роль в формировании иммуносупрессии при инфильтративном, диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких играют Т-рег с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. При этом их количество в крови повышено как при лекарственно-резистентном, так и при лекарственно-чувствительном туберкулезе легких. Продемонстрировано увеличение количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Т-рег при лекарственно-резистентных вариантах инфильтративного и фиброзно-кавернозного туберкулеза легких.

**Ключевые слова:** регуляторные Т-клетки, иммуносупрессия, туберкулез легких, лекарственная устойчивость.

Subpopulation structure of regulatory T-cells of peripheral blood in patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis depending on the clinical form of disease and sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-tuberculosis drugs have been analyzed in this work. It has been shown that in formation immune suppression at infiltrative, dissemination and fibrosis-cavity pulmonary tuberculosis the leading part play natural regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-T-lymphocytes. Thus increase of their number in blood at drug-resistance and drug-susceptible patients. It has been demonstrated that in patients with fibro-cavernous and infiltrative form of the disease and drug-resistance pulmonary tuberculosis the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-regulatory T-cells were increasing.

**Key words:** regulatory T-cells, immune suppression, pulmonary tuberculosis, drug resistance.

УДК 616.24-002.5:615.015.6:577.27

### Введение

Несмотря на то что с момента открытия регуляторных Т-клеток (Т-рег) в 1995 г. японским иммунологом S. Sakaguchi прошло уже больше 15 лет, они по-прежнему находятся под пристальным вниманием исследователей во всех ведущих иммунологических центрах мира. Такой интерес ученых к проблеме регуляторных Т-клеток обусловлен не только важностью их функциональных особенностей, но и широким кругом практически значимых проблем клинической иммунологии, с которыми связаны Т-рег. Роль Т-рег в иммунном ответе переоценить невозможно, но глав-

ные их функции заключаются в способности обеспечивать периферическую иммунологическую толерантность к аутоантигенам и супрессировать пролиферацию различных клонов Т-хелперов (Th), — Th1, Th2, Th17, Tfh [5, 7]. Основными последствиями дефицита регуляторных Т-клеток являются формирование аутоиммунной патологии, развитие аллергических заболеваний, нарушение нормального течения беременности и невынашивание плода. Вместе с тем, избыточная активность Т-рег связана с повышением риска возникновения онкологических заболеваний и ослаблением противоинойфекционной защиты организма с формиро-

ванием вторичной иммунологической недостаточности [6, 10].

Цель работы — оценить особенности субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток в крови больных с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам.

## Материал и методы

Проведено обследование 75 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких (53 мужчины и 22 женщины в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст  $(44 \pm 12)$  лет). Диагноз «туберкулез легких» (ТБ) устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все обследованные были разделены на три группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 46 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) — 19 пациентов, с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТБ) — 10 больных. При делении больных ТБ на группы учитывали также лекарственную чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (ППП): группу пациентов, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ), чувствительные к основным ППП, составили 46 человек, во вторую группу были включены 29 больных, выделяющих МБТ, устойчивые к ППП основного ряда. Контрольная группа была сформирована из 18 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту (12 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст  $(41 \pm 7)$  лет).

Материалом исследования являлась периферическая венозная кровь. Забор крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл.

Для определения сочетанной экспрессии поверхностных CD4- и CD25-маркеров на лимфоцитах периферической крови и внутриклеточного маркера Foxp3 применяли метод проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием специфических моноклональных антител (МАТ), меченных флуоресцентными метками (FITC, PE и PE-Cy5 Becton Dickinson (BD), США). Анализ образцов клеточных суспензий

проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с аргоновым лазером на основе определения пяти параметров: малого углового (FSC, характеризующего размер клетки), бокового (SSC, характеризующего цитоплазматические и мембранные особенности клетки) светорассеяния и трех показателей флуоресценции — зеленой (FITC — 530 нм), оранжевой (PE — 585 нм) и малиновой (PE — Cy5 — 610 нм) в гейте мононуклеарных клеток, выявляемых на FL1-, FL2-, FL3-каналах. Использовали автоматическое программное обеспечение, методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала).

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS 11.0. Так как распределение выборок отличалось от нормального, рассчитывали медиану  $Me$ , первый и третий квартили ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ). Для оценки достоверности различий выборочных данных, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали  $U$ -критерий Манна—Уитни для независимых выборок. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

На сегодняшний день репертуар идентифицированных Т-рег весьма разнообразен, при этом выделяют, как минимум, две основные разновидности регуляторных Т-клеток: естественные тимические регуляторные Т-клетки ( $\gamma\delta$ T, NKT, T-reg) и индуцированные на периферии (T-reg, Tr1, Th3, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) [7, 11]. Предполагается, что естественные Т-рег-клетки имеют фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, в то время как к индуцированным CD4<sup>+</sup> регуляторным Т-клеткам относятся лимфоциты с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>, а также CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>-гетерогенная субпопуляция Т-лимфоцитов, включающая в себя как регуляторные Т-клетки, так и активированные CD4<sup>+</sup> Т-хелперы. Следует отметить, что субпопуляция Т-рег-клеток, имеющая иммунофенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, отнесена как к естественным, так и к индуцированным Т-рег, поскольку кроме антигеннезависимой дифференцировки в тимусе в процессе нормального развития организма установлена возможность конверсии Т-хелперов в Т-рег на периферии при реализации адаптивного иммунного ответа [6, 7]. При этом доказано, что супрессорной активно-

стью обладают только Foxp3-экспрессирующие T-reg-клетки, т.е. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>-Т-лимфоциты, в то время как транскрипционный фактор Foxp3 является самым точным маркером идентификации T-reg [8].

При изучении субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток периферической крови у больных ИТБ и ДТБ в острый период заболевания было выявлено достоверное снижение по сравнению с нормой числа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>-клеток вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя (таблица). Данный факт можно рассматривать как проявление Т-клеточного иммунодефицита, связанного либо с угнетением пролиферации CD4<sup>+</sup>-Т лимфоцитов, либо с их быстрой элиминацией из периферической крови посредством индукции апоптоза лимфоцитов антигенами МБТ. Ранее проведенными исследованиями показано, что потеря равновесия между пролиферацией Т-клеток и индуцированным рецепторным апоптозом приводит к массовой гибели антиген-специфических клонов Th-лимфоцитов. Это является одним из факторов длительной персистенции инфекции в организме с развитием тяжелых форм вторичного иммунодефицита [3, 4, 9].

Анализ количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-T-reg в крови выявил его увеличение у больных ИТБ и ДТБ вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя, что может способствовать формированию супрессии Th1-ответа с целью предотвращения развития гиперергической иммунной реакции и повреждения ткани легких. Интересно, что при лекарственно-устойчивом (ЛУ) ФКТБ данный параметр был статистически выше не только в сравнении с контрольными значениями, но и относительно группы больных с лекарственно-чувствительным (ЛЧ) ТБ этой клинической формы (таблица). Столь значительное увеличение количества T-reg при резистентном к лечению ФКТБ позволяет предполагать глубокое угнетение иммунного ответа с формированием функциональной несостоятельности всех клеток, участвующих в нем. Следует отметить, что штаммы микобактерий, устойчивые к стандартной химиотерапии, обладают определенными свойствами в отношении реализации механизмов иммуносупрессии, возможно, посредством активации образования на периферии анергичных Т-клеток с супрессорной активностью [1, 2]. Интересно, что достоверное увеличение количества регуляторных Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

было обнаружено только в группах пациентов, страдающих ЛУТБ, а именно у больных с ИТБ и ФКТБ. При этом у больных с фиброзно-кавернозным ЛУТБ данный параметр был более чем в 3 раза выше, чем при лекарственно-чувствительной форме заболевания (таблица).

Вполне вероятно, что при лекарственно-резистентном ТБ, с одной стороны, происходит активная пролиферация и увеличение общего пула регуляторных Т-клеток как за счет естественных, так и за счет индуцированных Т-reg, с другой стороны, как указывалось выше, лекарственно-устойчивые штаммы МБТ могут способствовать угнетению иммунного ответа посредством индукции Т-reg-клеток [2]. В свете показанных изменений с учетом данных литературы можно предположить, что поддержание эффективного иммунного ответа в такой ситуации становится невозможным. Очевидно, что в дальнейшем Т-reg-опосредованная иммуносупрессия неизбежно приведет к утяжелению течения патологического процесса у больных ТБ в случае как изначально диагностированной лекарственной устойчивости (первичной), так и вторично сформировавшейся на фоне проведения химиотерапии.

**Содержание регуляторных Т-лимфоцитов в крови больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (Me (Q<sub>1</sub>—Q<sub>3</sub>))**

Группа обследованных лиц		CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>-</sup> , %	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> , %	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> , %
Здоровые доноры		25,45 (22,30—27,60)	2,63 (2,00—3,29)	5,00 (4,76—10,00)
Больные с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких	Инфильтративный ТЛ	10,00 (7,00—22,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,002	4,00 (4,00—8,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,006	6,00 (4,10—10,00)
	Диссеминированный ТЛ	13,50 (10,00—17,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,006	5,21 (2,75—9,50) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,017	5,50 (4,00—9,00)
	Фиброзно-кавернозный ТЛ	19,50 (11,00—32,50) <i>p</i> <sub>3</sub> = 0,013	2,80 (2,10—3,70) <i>p</i> <sub>3</sub> = 0,010	3,00 (2,00—6,00) <i>p</i> <sub>2</sub> = 0,011
Больные с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких	Инфильтративный ТЛ	16,00 (9,00—27,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,043 <i>p</i> <sub>4</sub> = 0,014	5,00 (2,00—8,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,042	9,00 (5,00—13,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,005 <i>p</i> <sub>4</sub> = 0,043
	Диссеминированный ТЛ	15,00 (7,00—19,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,0063	4,00 (3,00—7,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,031	7,00 (5,00—8,00)
	Фиброзно-кавернозный ТЛ	18,00 (12,00—25,00)	7,00 (2,00—10,00) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,002	11,00 (8,00—12,50) <i>p</i> <sub>1</sub> = 0,012

$p_1 = 0,032$      $p_4 = 0,007$

Примечание.  $p_1$  — уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  — по сравнению с параметрами у больных ИТБ;  $p_3$  — по сравнению с параметрами у больных ДТБ;  $p_4$  — по сравнению с параметрами при ЛЧТБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2013 гг.» (ГК № 16.512.11.2046 от 14 февраля 2011 г.).

#### Литература

1. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К. Иммунопатология туберкулеза легких. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. 194 с.
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В. и др. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2004. № 11. С. 23–28.
3. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Никонов С.Д. и др. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных туберкулезом легких // Бюл. СО РАМН. 2010. Т. 30, № 2. С. 101—108.
4. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Леплина О.Ю. и др. Роль PD-1/B7-H1-опосредованного пути в нарушении антиген-специфического ответа у больных туберкулезом легких // Иммунология. 2011. Т. 32, № 2. С. 89—93.
5. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. СПб.: Изд-во «Фолиант», 2011. 480 с.
6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с.
7. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология: атлас. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 624 с.
8. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Мед. иммунология. 2011. Т. 13, № 1. С. 7—16.
9. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Воронкова О.В. и др. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции // Туберкулез и болезни легких. 2011. № 3. С. 3—7.
10. Lee D.C., Harker J.A., Tregoning J.S. et al. CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection // J. Virol. 2010. V. 84, № 17. P. 8790-8798.
11. Liston A., Lu L.-F., O'Carroll D. et al. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function // J. Exp. Med. 2009. V. 205, № 9. P. 1993—2004.

Поступила в редакцию 10.06.2011 г.

Утверждена к печати 11.07.2011 г.

#### Сведения об авторах

**Е.Г. Чурина** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Новицкий** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**О.И. Уразова** — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**О.В. Воронкова** — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Ю.В. Колобовникова** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

Чурина Елена Георгиевна, тел.: 8 (382-2) 52-63-25; 8-913-806-0700; e-mail: lena1236@yandex.ru