

А.А. Кошкина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, И.Е. Есимова, Р.Р. Хасанова

ОСОБЕННОСТИ CD3/CD28-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕКРЕЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Сибирский государственный медицинский университет (Томск)

В статье представлены результаты исследования CD3/CD28-индуцированной продукции интерлейкина-2 лимфоцитами крови *in vitro* и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких. Установлено снижение общего числа CD3-позитивных клеток и угнетение секреции IL-2 при CD3/CD28-индукции лимфоцитов, наиболее выраженное при диссеминированной форме лекарственно-устойчивого туберкулеза легких. Продемонстрировано снижение процентного содержания CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ и CD3⁺CD28⁺IL-2⁻ клеток у больных туберкулезом легких на фоне увеличения количества CD3⁺CD28⁻IL-2⁻ лимфоцитов в крови. Показано, что выявленные изменения носят односторонний характер, не зависят от клинической формы туберкулеза легких и максимально проявляются у пациентов с лекарственно-резистентным вариантом туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: туберкулез легких, Т-лимфоциты, интерлейкин-2, межклеточная кооперация

PECULIARITIES OF CD3/CD28-INDUCED SECRETION OF INTERLEUKIN-2 AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

A.A. Koshkina, V.V. Novitskij, O.I. Urazova, I.E. Esimova, R.R. Hasanova

Siberian State Medical University, Tomsk

The article presents the results of the research of CD3/CD28-induced production of interleukin-2 by blood lymphocytes *in vitro* as well as subpopulation composition of peripheral blood T-lymphocytes in patients with drug-sensitive and drug-resistant pulmonary tuberculosis. We detected the decrease in the total amount of CD3-positive cells and suppression of IL-2 secretion during CD3/CD28-induction of lymphocytes, which was most expressed in a disseminated form of drug-resistant TB. We also demonstrated the reduction in the percentage value of CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ and CD3⁺CD28⁺IL-2⁻ cells in patients with pulmonary TB against the background of the increase in the percentage value of CD3⁺CD28⁻IL-2⁻. Besides, it was also shown that the detected changes are unidirectional, don't depend on a clinical form of TB and are maximally manifested in patients with a drug resistant variant of the TB process.

Key words: pulmonary tuberculosis, T-lymphocytes, interleukin-2, intercellular cooperation

Туберкулез легких (ТЛ) занимает одну из ведущих позиций среди социально-значимых заболеваний. Патогенез туберкулезной инфекции в современных условиях обусловлен, с одной стороны, изменением биологических свойств возбудителя инфекции и увеличением доли штаммов *M. tuberculosis*, обладающих множественной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, с другой стороны — дисфункцией иммунной системы.

В настоящее время среди причин, лежащих в основе развития ТЛ, особое значение отводится комплексу этиологических и патогенетических факторов, обуславливающих нарушение иммунного ответа на *M. tuberculosis* и формирование вторичной иммунологической недостаточности (ВИН), сопровождающей данное заболевание. Наличие ВИН существенно влияет как на течение туберкулезного процесса, так и на качество этиотропной терапии; ее характерной особенностью является дисбаланс в цитокиновой сети, проявляющийся, как правило, гипопродукцией профилирующих цитокинов, ответственных за «поляризацию» дифференцировки наивных Т-лимфоцитов хелперов (Th) в Th1-клетки и развитие иммунного Th1-ответа [2]. Наиболее отчетливо с характером течения туберкулезной

инфекции связаны изменения секреции интерлейкина-2 (IL-2), являющегося основным аутокринным ростовым фактором и активатором Т-лимфоцитов, обладающим способностью направлять дифференцировку наивных Т-клеток по Th1-пути. Гипопродукция IL-2, регистрируемая при ТЛ, в настоящее время считается основным критерием ВИН и рассматривается среди основных факторов неэффективности иммунного ответа на *M. tuberculosis* [9].

Среди причин, приводящих к гипосекреции IL-2, рассматриваются нарушения процессов межклеточной кооперации, реализуемые как путем непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, так и посредством цитокинов. Известно, что передача импульсов, опосредованная Т-клеточным рецептором (CD3/TCR), осуществляется путем соединения CD3/TCR лимфоцита с МНС-пептидным комплексом антигенпрезентирующей клетки (АРС) при участии корецептора CD4 и костимуляции со стороны молекул CD80/CD86 на АРС, связывающихся с CD28-молекулой на Т-клетках [1, 2]. В комплексе происходит передача импульса, который через сложную серию каскадных реакций приводит к активации ядерных факторов NFκB, NFAT и AP-1,

следствием которой является секреция IL-2, клональная пролиферация и дифференцировка Th0-клеток в клетки-эффекторы [1, 5]. В отсутствие костимуляторного сигнала Т-лимфоциты теряют способность эффективно «отвечать» на антигенные стимулы и подвергаются апоптозу [11]. Вместе с тем сведения, касающиеся механизмов нарушений передачи сигнала комплексом CD3/TCR – CD28, при туберкулезе носят фрагментарный, несистематизированный характер, что не позволяет однозначно оценить наличие и направленность патологических изменений, приводящих к снижению активности Th1-лимфоцитов.

В свете изложенного, целью настоящего исследования явилось оценить особенности CD3/CD28-индуцированной продукции IL-2 и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов крови при различных клинико-патогенетических вариантах туберкулеза легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В программу исследования вошли 65 пациентов (51 мужчина и 14 женщин) с впервые выявленными распространенными формами туберкулеза легких в возрасте 20 – 55 лет. Все пациенты в зависимости от устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам были разделены на две группы – больные с лекарственно-чувствительным (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ), каждая группа в свою очередь была разбита на подгруппы в зависимости от формы заболевания (инfiltrативный, диссеминированный ТЛ).

Диагноз ТЛ и его форма устанавливались на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. У всех обследованных пациентов отмечался распространенный (более 4 сегментов) деструктивный характер поражения легочной ткани с вовлечением в патологический процесс преимущественно обоих легких. В исследование не включались: больные, получавшие терапию глюкокортикостероидами и нестероидными противовоспалительными препаратами на момент исследования; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкопатология, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми заболеваниями (гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, гепатит, ВИЧ-инфекция); больные, которым была назначена иммунотерапия.

Контрольную группу составили практически здоровые мужчины (11) и женщины (10) (всего 21 человек) с сопоставимыми характеристиками по возрасту, не имеющие в анамнезе легочной патологии, тяжелых аллергических реакций, хронических инфекционных заболеваний, а также патологических изменений в легких (по данным флюорографического исследования). Частота заболевания острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями у лиц контрольной группы не превышала 3 раз в год.

Материалом для исследования служила гепаринизированная (25 Ед/мл) кровь больных ТЛ, взятая

утром натощак из локтевой вены. Исследование проводили однократно, до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии.

Выделение мононуклеарных клеток осуществляли стандартно на двойном градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 и 1,083 г/см³). Разделение мононуклеаров на моноциты и лимфоциты проводили методом адгезии к пластику. Идентификацию клеток осуществляли путем витальной окраски азур II-озином. Жизнеспособность выделенных лимфоцитов (по данным трипанового теста) составляла 97 %. Культивирование полученных клеточных суспензий осуществляли в полной питательной среде по методу Е.Д. Гольдберга и соавт. (1992) с поэтапным добавлением в культуру клеток моноклональных антител к CD3-, CD28-молекулам («R&D Systems», США) и блокатора внутриклеточного транспорта мөненин («Sigma», США). Образцы инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37⁰С. Общее время инкубации составило 12 ч. Для изучения CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 образцы инкубировали в присутствии моноклональных антител к CD3-, CD28-молекулам («R&D Systems», США) в CO₂-инкубаторе при температуре 37⁰С в течение 48 ч.

Процедуру окрашивания поверхностных молекул (CD3, CD28) и внутриклеточного IL-2 осуществляли согласно протоколам фирмы производителя («R&D Systems», США), она включала в себя фиксацию, пермеабиллизацию и окрашивание специфическими моноклональными антителами. Определение уровня экспрессии рецепторных молекул и внутриклеточного анализита в лимфоцитах крови проводили методом трехцветной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием изотипических контролей («R&D Systems», США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD Cell Quest for Mac OS® X.

Уровень базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с методическими рекомендациями фирмы-производителя («eBioscience Company», США). Регистрацию оптической плотности содержимого ячеек планшета проводили на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного пакета «Multiskan Magic». Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

Обработку полученных результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.» и пакета программ «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовали тест Шапиро-Вилка. При сравнении анализируемых выборок проверяли гипотезу о равенстве их генеральных дисперсий с помощью критерия Фишера. В случае нормального

распределения признака в исследуемых выборках и равенстве их генеральных дисперсий проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, при различных дисперсиях — с помощью критерия Аспина — Уэлча. Для оценки статистической значимости отличий между независимыми выборками с ненормальным распределением и равными дисперсиями использовали непараметрический критерий Манна — Уитни, при различных дисперсиях — критерий Уолда — Вольфовита. С целью установления взаимосвязей между изучаемыми количественными показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (нормальное распределение) и Спирмена (ненормальное распределение). При уровне значимости $p < 0,05$ различие двух сравниваемых величин считали достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ отмечались однонаправленные изменения цитокинпродуцирующей активности лимфоцитов, выражающиеся в снижении базальной секреции IL-2 по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров ($12,9 \pm 3,76$ пг/мл), наиболее выраженном при диссеминированном ЛУТЛ ($3,76 \pm 1,04$ пг/мл, $p < 0,001$). CD3/CD28-индукция клеток вызывала увеличение (по сравнению с базальным уровнем) продукции исследуемого цитокина во всех группах обследуемых лиц, которая, однако, была существенно ниже данного показателя в группе контроля. При этом наиболее выраженное угнетение стимулированной IL-2-секреции (относительно контрольных значений) было зафиксировано в группе больных инфильтративным ЛУТЛ.

На фоне выраженной гипосекреции IL-2 у больных ТЛ регистрировалось снижение количества лимфоцитов, несущих поверхностный маркер CD3, относительно показателей у здоровых доноров, наиболее выраженное при диссеминированной форме ЛУТЛ, где данный показатель снижался в 1,9 раза ($p < 0,001$). Наряду с этим во всех группах обследованных лиц с туберкулезной инфекцией устанавливалось резкое снижение процентного числа CD3⁺CD28⁺ клеток, содержащих внутриклеточный IL-2, по сравнению с таковым в контрольной группе. При этом степень выраженности данных нарушений была существенно выше при лекарственно-устойчивом ТЛ, чем при его лекарственно-чувствительном варианте, и не зависела от клинической формы заболевания. Такая же картина отмечалась относительно числа CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ клеток.

Процент CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов у больных ТЛ оказался выше такового в группе контроля, где данный показатель составил $49,08 \pm 10,9$ %. При этом при лекарственно-устойчивом варианте ТЛ независимо от клинической формы заболевания обнаруживалось более высокое процентное содержание CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ клеток относительно такового при лекарственно-чувствительном ТЛ. Корреляционный анализ позволил установить прямую зависимость между общим содержанием

CD3-позитивных клеток и числом CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов при лекарственно-устойчивом варианте инфильтративного ($R = 0,56$, $p = 0,0156$) и диссеминированного ($R = 0,57$, $p = 0,019$) ТЛ.

Угнетение секреторной активности Т-лимфоцитов, установленное в настоящем исследовании, во многом определяется снижением количества данной субпопуляции клеток. Уменьшение общего числа CD3-позитивных лимфоцитов может быть связано как с непосредственной гибелью клеток в очаге воспаления в легких, что приводит к ускоренной миграции Т-клеток из периферической крови [4, 6, 7], так и с запуском программы апоптоза лимфоцитов [8].

В качестве ключевых факторов активации апоптоза при действии на макроорганизм инфекционных агентов в настоящее время рассматриваются нерепарируемые повреждения и рецепторзависимая селекция клеток. Так, было показано, что патогенез иммунной анергии при туберкулезе может быть обусловлен индуцированной возбудителем дезорганизацией хромосомного аппарата иммунокомпетентных клеток и систем, обеспечивающих генетический гомеостаз макроорганизма. При этом угнетение индекса стимуляции ДНК-репарации в лимфоцитах крови при туберкулезе связывают с инфекционно-токсическим повреждением Т-лимфоцитов, которое может быть одной из причин запуска Fas-индуцированного апоптоза и снижения численности данной популяции клеток [8, 11].

Немалая роль в регуляции клеточной гибели принадлежит также фактору некроза опухоли (TNF) α , являющемуся ключевым регулятором иммунного ответа. В условиях туберкулезной инфекции TNF- α -опосредованная гибель иммунокомпетентных клеток может иметь доминирующее значение в развитии ВИН в виду индуцированной *M. tuberculosis* гиперсекреции данного цитокина. Так, известно, что CD4⁺ Т-лимфоциты являются более чувствительными к активации апоптоза за счет высокой экспрессии ими рецепторов FasR и TNFR1 и подавлением активности антиапоптотических генов семейства bcl-2 [11, 12].

Кроме того, установлено, что в индуктивной фазе иммунного ответа путем апоптоза удаляются Т-лимфоциты, не получившие одновременно адекватного костимулирующего сигнала при взаимодействии антигенспецифического рецептора с презентруемым антигеном. Показано, что вирулентные микобактериальные штаммы обладают способностью ингибировать экспрессию костимуляторных молекул CD80/CD86 и таким образом отменять сигнал, «разрешающий» активацию Т-хелперных клеток, участвующих в реакциях клеточно-опосредованного иммунитета, что также вносит вклад в уменьшение численности Т-лимфоцитов. Механизм реализации апоптоза в данном случае зависит от NF-AT-индуцированной экспрессии апоптотического фактора FasL в ответ на «неправильный» антигенный стимул, определяющей дальнейшую судьбу наивного Т-лимфоцита — гибель [8, 12]. В пользу данного предположения

может свидетельствовать регистрируемое нами снижение процентного числа Т-лимфоцитов, несущих поверхностный маркер CD28, у больных ТЛ, максимально выраженное при ЛУТЛ.

Однако следует отметить, что гипопродукция IL-2, а также снижение числа CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов у больных ТЛ могут быть обусловлены анергией Т-клеток. Выявленное нами увеличение процентного содержания CD3⁺CD28⁺IL-2⁺ лимфоцитов на фоне выраженной Т-лимфоцитопении и гипосекреции IL-2, вероятно, связано с увеличением числа регуляторных клеток (Treg), оказывающих супрессорное влияние на процессы лимфопролиферации и способствующие развитию Т-клеточной анергии [7]. При этом большое значение придается присутствию на поверхности Treg-лимфоцитов ингибитора костимуляции — молекулы CTLA-4 (cytotoxic T — lymphocyte — associated antigen 4), поскольку именно с этой молекулой связывают реализацию их супрессорной функции. CTLA4, в силу своей высокой avidности к молекулам CD80/CD86 на APC, способен предотвращать костимулирующее действие CD28-молекулы на Т-лимфоциты, блокируя костимуляторный сигнал и таким образом подавлять активацию наивных Т-клеток [3, 12]. Кроме того, важным механизмом в развитии анергии и гипосекреции IL-2 является захват последнего при помощи CD25-рецептора к IL-2 и секвестрация рецептора у эффекторных Т-клеток, что приводит к нарушению дифференцировки и клональной экспансии Th1-клеток [1]. Кроме прямого (контактного) механизма супрессии Th1-клонов лимфоцитов, активация Treg-клеток приводит к секреции супрессорных цитокинов. При дистантном механизме цитокины, выделяемые Treg, например, трансформирующий фактор роста (TGF) β, связываются со своими рецепторами на поверхности Т-эффекторных клеток и ингибируют их активацию, тем самым супрессируя иммунный ответ [6, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных ТЛ отмечается существенное снижение числа Т-лимфоцитов, гипосекреция IL-2 при CD3/CD28-индукции и изменение процентного соотношения субпопуляций CD3-позитивных клеток, проявляющееся увеличением числа CD28- и IL-2-негативных лимфоцитов. Выявленные изменения носят однонаправленный характер, не зависят от клинической формы ТЛ и максимально выражены у пациентов с лекарственно-резистентным вариантом туберкулезной инфекции. Учитывая, что передача активационного сигнала в процессе межклеточной кооперации, опосредованная Т-клеточным рецептором и костимуляцией через CD28, является одним из ключевых моментов

формирования противотуберкулезного иммунитета, выявленные нами изменения экспрессии основных Th1-направляющих молекул в лимфоцитах при ТЛ свидетельствуют о неспособности Т-клеток эффективно отвечать на антигенный стимул.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2046 от 14.02.2011 г.) и РФФИ (Проект №11-04-98057-р).

ЛИТЕРАТУРА

1. Зенин В.В. Динамика экспрессии CD25 в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных фитогемагглютинином или интерлейкином-2 // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 6. — С. 506 — 510.
2. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // РЖГГК. — 2008. — № 4. — С. 4 — 13.
3. Казимирский А.Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 2006. — № 1. — С. 2 — 7.
4. Новицкий В.В. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов у больных туберкулезом легких // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7, № 5 — 6. — С. 587 — 592.
5. Новицкий В.В. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом // Иммунология. — 2006. — № 2. — С. 76 — 79.
6. Новицкий В.В. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? // Бюл. сибир. мед. — 2006. — Т. 5, № 2. — С. 70 — 74.
7. Сахно Л.В. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 5. — С. 23 — 28.
8. Уразова О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких // Бюл. сибир. мед. — 2010. — № 5. — С. 5 — 13.
9. Хасанова Р.Р. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 3. — С. 31 — 35.
10. Чурина Е.Г. Роль gdT- и NK-клеток в иммунном ответе // Бюл. сибир. мед. — 2010. — № 5. — С. 138 — 142.
11. Чурина Е.Г. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях // Бюл. сибир. мед. — 2011. — № 4. — С. 103 — 111.
12. Шилько Т.А. Апоптоз лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // Вопр. патогенеза типовых патологических процессов: тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. — Новосибирск, 2009. — С. 392 — 396.

Сведения об авторах

Кошкина Анна Алексеевна — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 6/2, кв. 638; тел.: 8-961-887-27-14; e-mail: koshkina1986@yandex.ru)

Уразова Ольга Ивановна — профессор кафедры патофизиологии СибГМУ, доктор медицинских наук, профессор

Новицкий Вячеслав Викторович — заведующий кафедрой патофизиологии СибГМУ, заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН

Есимова Ирина Евгеньевна — докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, кандидат медицинских наук

Хасанова Резеда Рахматуллоевна — докторант кафедры патофизиологии СибГМУ, кандидат медицинских наук