

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 21.02.2022)
Полщина: учтена за 6 год с 21.08.2017 по 20.08.2018. Возможность восстановления: нет.(21)(22) Заявка: 2012135757/15, 20.08.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.08.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.08.2012

(45) Опубликовано: 20.01.2014 Бюл. № 2(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске:
ЧУРИНА Е.Г. Роль регуляторных Т-клеток в иммунопатогенезе туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью. Автореф. дисс. доктора мед. наук. - Томск, 25.01.2012, 24 с. [Найдено 05.06.2013] [онлайн], Найдено из Интернета: <URL:<http://www.dissers.ru/2meditsina/rol-regulyatornih-t-kletok-immunopatogeneze-tuberkuleza-legkih-mnozhestvennoy-lekarstvennoy-ustoychivostyu-14-03-03-patologicheskaya-fiziologiya-14-03-09.php>>. KZ 22314, 15.02.2010. RU 2171989 C1, 10.08.2001. LAZAREVIC V. et al. Induction of Mycobacterium tuberculosis-specific primary and secondary T-cell responses in interleukin-15-deficient mice. Infect Immun. 2005 May; 73(5):2910-22 [Найдено 06.06.2013] [онлайн], Найдено из Интернета: <URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1087383/pdf/2071-04.pdf>>.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ ВПО
СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

**Чурина Елена Георгиевна (RU),
Уразова Ольга Ивановна (RU),
Новицкий Вячеслав Викторович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России) (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВТОРИЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и предназначено для диагностики вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких. До назначения специфической химиотерапии проводят иммунологическое исследование периферической крови больных туберкулезом легких и определяют клеточные, гуморальные и молекулярно-генетические параметры иммунного статуса пациента. При содержании в периферической крови CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 2,6%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 5,1%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток более чем 0,2%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных менее чем 25,5%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов менее чем 35,4%, γδТ-лимфоцитов менее чем 4,9%, CD45RO⁺ Т-клеток памяти менее чем 8,9%; IL-2 менее чем 22,3 пг/мл, IL-4 более чем 40,0 пг/мл, IL-10 более чем 25,3 пг/мл, TGFB более чем 1109,0 пг/мл одновременно с носительством аллеля G и генотипа GG T-330G гена IL2 и аллеля A и генотипа AA C-592A гена IL10, аллеля T и генотипа TT C-509T гена TGFB и аллеля T и генотипа TT C-590T гена IL4 диагностируют вторичную иммунологическую недостаточность. Изобретение позволяет своевременно диагностировать дефекты иммунной системы у больных туберкулезом легких и применять меры коррекции лечебного воздействия с использованием современных методов иммуномодулирующей терапии. 6 ил., 4 табл., 1 пр.

Изобретение относится к области медицины, а именно к фтизиатрии и пульмонологии, клинической иммунологии, аллергологии и патологической физиологии и может быть использовано для диагностики вторичной иммунологической недостаточности (ВИН) у впервые выявленных больных с распространенным деструктивным туберкулезом легких (ТБ) до назначения специфической химиотерапии.

В основе патогенеза распространенного деструктивного ТБ лежит дисрегуляция антигенспецифического Th1-зависимого иммунного ответа [1, 2]. Однако, по-прежнему, остается открытым вопрос о том, включение каких механизмов иммунного ответа на Mycobacterium tuberculosis (МВТ) и на каком его этапе способствует возникновению «иммунной девиации», патологическому прогрессирующему течению туберкулезной инфекции и формированию многокомпонентной вторичной иммунологической недостаточности у больных ТБ. С другой стороны, развитие ТБ практически всегда происходит на фоне функциональной несостоятельности иммунного ответа. Таким образом, ВИН может быть как причиной, так и следствием клинической манифестации туберкулеза.

В течение последнего десятилетия при исследовании особенностей иммунопатогенеза ТБ особое внимание уделяется регуляторным Т-клеткам, которые обладают супрессорной активностью и способствуют снижению интенсивности

протективного антигенспецифического иммунного ответа, направленного на эрадикацию возбудителя [3, 4, 5]. Предполагается, что опосредованное регуляторными Т-клетками угнетение антигензависимой дифференцировки Th0-лимфоцитов и клональной экспансии Th-активированных и Th1-лимфоцитов лежит в основе формирования Т-клеточной и туберкулиновой анергии и, как следствие, ВИН у больных ТБ [6, 7]. «Репертуар» регуляторных Т-клеток весьма разнообразен, однако конкретные механизмы, с помощью которых они реализуют свои иммуносупрессорные потенции, остаются неустановленными. Между тем известно, что Т-лимфоциты с иммунофенотипом CD4⁺CD25⁺, содержащие внутриклеточный транскрипционный фактор Foxp3 (Treg), отличаются от Th1-, Th2-, Th17-, Th9-, Th22-, T_H17-, Th-активированных клеток по спектру секретируемых цитокинов и способны супрессировать функции всех перечисленных клонов Т-хелперов [3, 8]. Конверсия, индукция Treg и реализация ими супрессорных свойств опосредуются преимущественно иммунорегуляторными цитокинами - интерлейкином (IL) 2, IL-4, IL-10, трансформирующим фактором роста (TGF) β. Допускается также возможность прямого контактного взаимодействия Treg с клеткой-мишенью, влияние Treg на апоптоз и пролиферацию лимфоцитов [9, 10].

В иммунопатогенезе ТБ тесно взаимосвязаны механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, посредниками которых считаются, в том числе, γδТ-клетки [11, 12]. Они играют решающую роль не только в реализации ответа «первой линии защиты» на патоген, но и выполняют регуляторные функции. В структуре цитокинов, секретируемых регуляторными Т-клетками, наиболее широким спектром супрессорного воздействия обладают TGFβ, IL-10 и IL-4 [13]. Кроме того, высказывается предположение о связи генетически детерминированной гипер- или гипопродукции цитокинов-супрессоров с качеством иммунного ответа, тяжестью и продолжительностью инфекционных заболеваний [14, 15].

В связи с изложенным, комплексное изучение этиопатогенетических факторов иммунопатологических изменений и анализ причинно-следственных взаимосвязей между ними при туберкулезной инфекции является актуальным и может служить основой для разработки новых подходов к диагностике и персонализированной коррекции ВИН у впервые выявленных больных с распространенными деструктивными формами ТБ.

Известен способ прогнозирования течения ТБ. Данный вариант прогнозирования течения ТБ основан на выделении L-форм микобактерий из мокроты пациентов, страдающих ТБ, и определении у возбудителей заболевания антилизоцимной активности [16]. В том случае, если параметр антилизоцимной активности оказывался равным или больше 4 мкг/мл, можно с полной уверенностью прогнозировать обострение течения ТБ. Одним из важнейших недостатков этого метода является сложность исполнения и опасность заражения сотрудников лаборатории, т.к. для данного метода необходимо выделять L-формы микобактерий. Кроме того, в данной модели анализируется прогноз течения основного заболевания, а не формирования сопутствующей ВИН.

Известен способ прогнозирования возможных вариантов иммунокорректирующей терапии вторичных иммунодефицитных состояний, который имеет достаточно широкое применение во многих областях медицины, таких как терапия, педиатрия, фтизиатрия, хирургия и иммунология. Изобретение основывается на контроле параметров иммунного статуса и отличается от остальных патентов тем, что на каждом этапе иммунокорректирующей терапии происходит восстановление наиболее поврежденного звена иммунной системы, после чего вновь производят исследование параметров иммунного статуса с последовательным подбором препаратов иммунокорректирующей терапии, направленных на восстановление вновь обнаруженных нарушений в соответствующих звеньях иммунной системы [17]. Несмотря на свою информативность, данное изобретение достаточно сложно в исполнении и не позволяет выявлять нарушения иммунного ответа на молекулярно-генетическом уровне.

Известен способ диагностики вторичного иммунодефицита, который включает в себя исследование периферической крови, в которой определяют формулу дисбаланса в иммунной системе путем выбора трех наиболее отличающихся от нормы показателей. Отбор осуществляют с помощью критерия диагностической значимости из количества Т-, В-лимфоцитов и иммуноглобулинов (Ig) классов А, G, М по направлению динамики их изменений. При разработке данного метода диагностики ВИН было обследовано 1304 человека с 33 различными патологиями, у которых выявляли три параметра, наиболее значимо отличающихся от контрольных значений и указывающих на то, в какую сторону изменялись иммунологические показатели, имеющие характерную особенность для каждой из патологий. Диагностику осуществляют для конкретной патологии по таблице. Способ обеспечивает повышение точности и сокращение времени диагностики вторичного иммунодефицита [18]. Однако данный способ диагностики ВИН не является специфичным по отношению к ТБ и дает весьма схематичное представление об особенностях дефектов иммунной системы.

Был проведен патентный поиск в зарубежной патентной базе данных Worldwide (www.espacenet.com), который позволил выявить следующие изобретения. В 2009 г. в Калифорнийском университете зарегистрирован способ серологической экспресс-диагностики у млекопитающих активного туберкулезного воспаления легочной и внелегочной локализации, основанный на определении активности микобактериальной глутамин-синтетазы. Глутамин-синтетаза - ферментативный белок с молекулярной массой 53 кДа. Он играет центральную роль в метаболизме азота, катализирует синтез L-глутамин в L-глутамат, аммиак и АТФ. Установлено, что только патогенные микобактерии, такие как *M.tuberculosis* и *M.bovis*, высвобождают большие количества глутамин-синтетазы в отличие от непатогенных микобактерий (*M.smegmatis* и *M.phlei*). Таким образом, высокий уровень активности в культуральном фильтрате глутамин-синтетазы коррелирует с патогенностью

микобактерии. Способ, предложенный авторами изобретения, заключается в определении активности фермента в сыворотке крови пациентов с целью диагностики активного туберкулеза, перехода латентной инфекции в активный процесс, а также для контроля эффективности специфической противотуберкулезной химиотерапии. Высокая активность бактериальной глутамин-синтетазы в сыворотке крови больного через 15 дней после начала лечения свидетельствует о неэффективности используемых препаратов, а значит - о наличии лекарственной устойчивости у инфицирующего штамма *M.tuberculosis* [19]. В этой модели продемонстрирована оценка эффективности специфической химиотерапии ТБ, в то время как наличие/отсутствие у больных ВИН не анализируется.

Различия в геноме (и, как следствие, в антигенной структуре) между эпидемически значимым штаммом *M.tuberculosis* и вакцинным штаммом *M.bovis* были положены в основу способа иммунологической диагностики туберкулеза, предложенного в 2004 г. коллективом авторов из STATENS SERUM INSTITUTE. Установлено, что белковые компоненты, входящие в состав инфицирующих штаммов микобактерий, отличаются от таковых для вакцинного штамма. Использование «коктейля» протеинов микобактериального происхождения (состав и иммуногенная активность компонентов белковой смеси предложены авторами изобретения) значительно (до 93%) повышает чувствительность и специфичность иммунологического метода диагностики туберкулезной инфекции. В частности показано, что добавление в культуральную среду мононуклеаров периферической крови смеси антигенов микобактериального происхождения (ESAT6+CFP10+Rv3 873poolA+Rv2654 14/15) вызывает усиление продукции IFN- γ у больных с активным туберкулезом, и напротив, не оказывает активирующего влияния на цитокин-продуцирующую активность клеток у BCG-вакцинированных лиц [20]. В данной модели исследован генотип возбудителя, который, безусловно, может модулировать течение иммунного ответа на МБТ, но не установлена роль конкретных дефектов иммунной системы.

В ходе проведения патентного поиска не было выявлено источника информации, в котором был описан способ эффективного и информативный способ диагностики ВИН у впервые выявленных больных с распространенным деструктивным ТБ до назначения специфической химиотерапии.

Новая техническая задача - создание точного и информативного способа диагностики ВИН у больных ТБ.

Для решения поставленной задачи в способе диагностики вторичной иммунологической недостаточности у впервые выявленных больных с ТБ до назначения специфической химиотерапии, проводят иммунологическое исследование периферической крови больных ТБ и определяют клеточные, гуморальные и молекулярно-генетические параметры иммунного статуса пациента, определяют количество γ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных, CD45R0⁺ Т-клеток памяти, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ и CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток, секрция *in vitro* IL-2, IL-4, IL-10, TGF β и аллельные варианты генов иммунорегуляторных цитокинов IL2, IL4, IL10, TGF β и при относительном содержании в периферической крови CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 2,6%, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 5,1%, CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток более чем 0,2%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных менее чем 25,5%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов менее чем 35,4%, γ Т-лимфоцитов менее чем 4,9%, CD45R0⁺ Т-клеток памяти менее чем 8,9%; содержании IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови менее чем 22,3 пг/мл, IL-4 - более чем 40,0 пг/мл, IL-10 - более чем 25,3 пг/мл, TGF β - более чем 1109,0 пг/мл одновременно с носительством «низко продуцирующего» аллеля G и генотипа GG (T-330G) гена IL2 и «высоко продуцирующих» аллеля A и генотипа AA (C-592A) гена IL10, аллеля T и генотипа TT (C-509T) гена TGF β и аллеля T и генотипа TT (C-590T) гена IL4 диагностируют вторичную иммунологическую недостаточность.

Способ осуществляют следующим образом:

Производят забор периферической крови из вены, утром, натощак. Материалом исследования служат лимфоциты крови и супернатанты культуральных суспензий мононуклеаров периферической крови больных туберкулезом легких.

До назначения специфической химиотерапии, проводят иммунологическое исследование периферической крови больных ТБ и определяют клеточные, гуморальные и молекулярно-генетические параметры иммунного статуса пациента, определяют количество γ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных, CD45R0⁺ Т-клеток памяти, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ и CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток, секрция *in vitro* IL-2, IL-4, IL-10, TGF β и аллельные варианты генов иммунорегуляторных цитокинов IL2, IL4, IL10, TGF β и при относительном содержании в периферической крови CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 2,6%, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток более чем 5,1%, CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток более чем 0,2%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных менее чем 25,5%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов менее чем 35,4%, γ Т-лимфоцитов менее чем 4,9%, CD45R0⁺ Т-клеток памяти менее чем 8,9%; содержании IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови менее чем 22,3 пг/мл, IL-4 - более чем 40,0 пг/мл, IL-10 - более чем 25,3 пг/мл, TGF β - более чем 1109,0 пг/мл одновременно с носительством «низко продуцирующего» аллеля G и генотипа GG (T-330G) гена IL2 и «высоко продуцирующих» аллеля A и генотипа AA (C-592A) гена IL10, аллеля T и генотипа TT (C-509T) гена TGF β и аллеля T и генотипа TT (C-590T) гена IL4 диагностируют вторичную иммунологическую недостаточность.

Для определения поверхностных молекул CD3, CD4, CD25, CD45R0, γ TCR и

внутриклеточного маркера иммуносупрессорной активности Foxp3 в лимфоцитах периферической крови применяют метод проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками. Процедуру окрашивания поверхностных (CD3, CD4, CD25, CD45R0, γ TCR) и внутриклеточного (Foxp3) маркеров проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Порядок выполнения исследования:

Определение количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток в периферической крови

После выделения мононуклеарные лейкоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4) и стандартизировали количество клеток в суспензии до 10×10⁶ клеток/мл. Для окрашивания поверхностных маркеров (CD4, CD25) лимфоцитов периферической крови к суспензии мононуклеарных лейкоцитов добавляли по 20 мкл соответствующих специфических МКАТ, меченных флуоресцентными метками: МКАТ к CD4, меченные FITC (кат. №345768), и МКАТ к CD25, меченные PE-Cy5 (кат. №555433) («Becton Dickinson (BD)», США). Пробы инкубировали 20 мин при комнатной температуре, защищая от света. Для окрашивания внутриклеточного маркера Foxp3 проводили процесс пермеабилзации лимфоцитов. Для этого в каждую пробирку поочередно вносили рабочие растворы стандартных буферов: Human Foxp3 Buffer A и Human FoxP3 Buffer C из набора BD Pharmingen Human Foxp3 Buffer Set (кат. №560098). Буферы разводили согласно прилагаемой инструкции. Лейкоциты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темном месте. Затем клетки дважды отмывали 2 мл фосфатно-солевого буфера (РН=7,4). В ресуспендированный осадок вносили антитела к внутриклеточному маркеру Foxp3, меченные PE (кат. №560046), в количестве 20 мкл и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки дважды отмывали 2 мл фосфатно-солевого буфера (РН=7,4), к осадку добавляли 400 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего пробы были готовы к измерению. Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по пяти параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и трем показателям флуоресценции - зеленой (FITC - 530 нм), оранжевой (PE - 585 нм) и малиновой (PE-Cy5 - 610 нм), выявляемой на FL1-, FL2- и FL3-каналах (Фиг.1-3).

На Фиг.3 в нижнем правом квадранте находятся клетки, экспрессирующие одновременно CD4-, CD25- и не содержащие внутриклеточный маркер Foxp3 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторные Т-лимфоциты/Т-хелперы активированные), в верхнем правом квадранте находятся CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки, в верхнем левом квадранте - CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторные Т-клетки.

На графике FSC против SSC выделяли гейт 1 - лимфоциты (Фиг.1). Гейт 1 прикладывали к событиям на графике SSC против FL-1 (CD4-FITC), гейтом 2 очерчивали популяцию клеток, несущих CD4 (Фиг.2). Гейт 2 прикладывали к графику FL-2 (Foxp3-PE) против FL-3 (CD25- PE-Cy5) (Фиг.3). Результаты выражали в процентах.

Определение количества CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов и CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток в периферической крови

Для определения поверхностных антигенов CD3, CD4 и CD25 на лимфоцитах периферической крови применяли метод лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными метками. Процедуру окрашивания маркеров CD3, CD4 и CD25 проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Ход работы. После выделения мононуклеарные лейкоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4), каждый раз при этом ресуспендируя и центрифугируя в течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливали, а оставшийся осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и стандартизировали количество клеток в суспензии до 10×10⁶ клеток/мл. Для окрашивания лимфоцитов в цитометрические пробирки вносили по 50 мкл суспензии мононуклеарных лейкоцитов и по 20 мкл конъюгированных МКАТ - CD3 (PerCP-Cy5,5)/CD4 (FITC)/CD25 (PE) («Becton Dickinson (BD)», США, кат. №333170), перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте.

Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по пяти параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и трем показателям флуоресценции - зеленой (FITC - 530 нм), оранжевой (PE - 585 нм) и малиновой (PerCP-Cy5,5 - 610 нм), выявляемой на FL1-, FL2-, FLS-каналах (Фиг.4).

Для анализа строили два промежуточных графика: FSC против SSC на котором выделяли гейт 1 - лимфоциты. Гейт 1 прикладывали к событиям на втором графике SSC против FL-3 (CD3-PerCP-Cy5,5), гейтом 2 очерчивали популяцию лимфоцитов, несущих CD3. Затем гейт 2 прикладывали к графику FL-1 (CD4-FITC) против FL-2 (CD25-PE) (Фиг.4). Результаты выражали в процентах.

На Фиг.4 в левом верхнем квадранте находятся лимфоциты, презентующие

одновременно CD3- и CD25-молекулы и не презентующие CD4-молекулу. В правом нижнем квадранте находятся лимфоциты с иммунофенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁻ (Т-хелперы).

Определение количества CD45R⁺ лимфоцитов (Т-клетки памяти) и $\gamma\delta$ TCR⁺ Т-клеток ($\gamma\delta$ Т-лимфоцитов) в периферической крови

Для определения в периферической крови лимфоцитов, презентующих маркеры CD45R0 и $\gamma\delta$ TCR, применяли метод лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ к лимфоцитарным рецепторам Anti-CD45R0, меченных PE (кат. №347967) («Becton Dickinson (BD)», США) и МКАТ к лимфоцитарным рецепторам Anti-TCR- $\gamma\delta$ -1, меченных PE (кат. №333141) («Becton Dickinson (BD)», США). Процедуру окрашивания лимфоцитов, несущих CD45R0-молекулу, и лимфоцитов, презентующих $\gamma\delta$ TCR, проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Ход работы. Процедуры пробоподготовки, окрашивания и измерения проводились аналогично охарактеризованным выше. Анализ образцов клеточных суспензий проводили по трем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и одному показателю флуоресценции - оранжевой (PE - 585 нм), выявляемой на FL2-канале (Фиг.5, Фиг.6). Для анализа строили промежуточный график: FSC против SSC, на котором выделяли гейт 1 - лимфоциты. Гейт 1 прикладывали к событиям на графике SSC против FL-2 (Anti-CD45R0-PE) (Фиг.5, Фиг.6). На Фиг.5 и Фиг.6 в нижних правых квадрантах находятся лимфоциты, презентующие CD45R0-молекулу (Т-клетки памяти) и $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ Т-лимфоциты). Результаты выражали в процентах.

Определение содержания иммунорегуляторных цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови *in vitro*

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови. Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) выдерживали при 37°C в течение 30 мин для отделения плазмы от эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности фиколл-урографин ($\rho=1077$ г/см³) («MP Biomedical, LLC», США) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали пипеткой, трижды отмывали средой RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 5%-й инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (ООО «БиолоТ», Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин. При использовании градиента указанной плотности 90-95% от всех выделенных мононуклеаров составляли лимфоциты.

Приготовление супернатантов. Для получения супернатантов выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Стандартизировали количество клеток в суспензии до $2,5 \times 10^6$ /мл. Для индукции секреторной функции мононуклеарных лейкоцитов в пробы вносили вакцинный штамм BCG в дозе 50 мкг/мл. В контрольные пробы вносили полную питательную среду. Клеточные суспензии в количестве 1 мл инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Супернатанты собирали и использовали для количественного определения цитокинов. Клетки осадка исследовали на жизнеспособность. Для этого 0,1 мл суспензии смешивали с равным объемом 0,5% трипанового синего («Serva» США) и заполняли счетную камеру Горяева. Жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов оценивали, вычитая число «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет.

Имуноферментный анализ для количественного определения содержания цитокинов. Для определения содержания IL-2, IL-4, IL-10 и TGF β в супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Процедуру ИФА проводили по инструкциям, предлагаемым отечественными (ЗАО «Вектор-Бест», ООО «Протеиновый контур») и зарубежными («Bender Medsystems» (США), «BCM Diagnostics» (США)) производителями тест-систем. Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой. Результаты выражали в пг/мл.

Исследование полиморфизма генов цитокинов

Выделение ДНК. Выделение ДНК из периферической крови проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Принцип метода. ДНК сорбируется на сорбент, затем отмывается буферным раствором и сорбент удаляется. Полученная ДНК используется для дальнейших определений.

Ход работы. Перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогревали при 65°C до полного растворения кристаллов. Отбирали необходимое количество одноразовых пробирок. Вносили в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора и по 100 мкл венозной крови. Пробу тщательно перемешивали на вортексе. Тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе и добавляли в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Пробу перемешивали на вортексе, ставили в штатив на 2 мин, затем еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 с. Удаляли супернатант в колбу-ловушку, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавляли в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1 и перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Осаждали сорбент

центрифугированием при 5000 об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удаляли супернатант вакуумным отсасывателем и отдельным наконечником для каждой пробы. Далее в пробы вносили по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешивали до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировали 30 с при 10000 об/мин, отбирали супернатант вакуумным отсасывателем и отдельным наконечником для каждой пробы (процедуру отмывки повторяли дважды). Пробирки с открытыми крышками помещали в термостат 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента. После этого в пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе и ставили в термостат 65°C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге при 12 (100 об/мин в течение 1 мин. Полученный супернатант содержал очищенную ДНК.

Исследование полиморфизма генов цитокинов

Исследование полиморфных участков генов цитокинов проводили с использованием аллельспецифичной амплификации специфических участков генома [21].

Принцип метода. Исследуемые аллельные варианты генов относятся к SNP-полиморфизмам, т.е. характеризуются заменой одного нуклеотида. Для детекции используется аллельспецифичная полимеразная цепная реакция (ПЦР). По наличию или отсутствию продукта амплификации делают заключение о характере полиморфизма.

Ход работы. Амплификацию осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс-200-1» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путем ПЦР, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе, с применением амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия).

Было исследовано четыре полиморфных варианта генов четырех цитокинов: T-330G гена IL2 (rs2069762), C-590T гена IL4 (rs2243250), C-592A гена IL10 (rs1800872), C-509T гена TGFβ (rs1800469). Все изученные полиморфизмы локализованы в промоторных участках соответствующих генов.

Общая реакционная смесь для амплификации объемом 25 мкл содержала: «нижнюю» смесь, состоящую из смеси праймеров («Синтол», Россия) и смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 2 мМ (dNTP-mix) в равных частях в отдельных пробирках на каждую пару праймеров; «верхнюю» смесь в конечной концентрации Mg²⁺ 2, 5, 10 мкл ПЦР-буфера, 2,5 мкл 50 мМ MgSO₄, 6,5 мкл H₂O и 1,0 мкл Tag-полимеразы (из расчета на одну пробирку). Раскапывали в микропробирки для ПЦР по 5 мкл «нижней» смеси и по 10 мкл «верхней» смеси. Сверху капали по 1 капле масла для ПЦР. Вносили сверху на масло по 10 мкл исследуемой ДНК. Программа амплификации включала в себя предварительную денатурацию при 96°C в течение 1 мин, с последующими 10 циклами, каждый из которых состоял из денатурации при 96°C (15 с), отжига при специфической для каждой пары праймеров при температуре 92°C (50 с), элонгации цепи при 72°C (40 с). Затем следовали 20 циклов, состоящих из денатурации при 96°C (10 с), отжига при 60°C (50 с) и элонгации при 72°C (40 с). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 1 мин. Анализ продуктов амплификации проводили разделением фрагментов ДНК в 2% агарозном геле: 2 г агарозы смешивали с 2 мл 50xтрис-ацетатного (ТАЕ) буфера (242 г трисаминометана, 37,2 г ЭДТА, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты довести до 1 л H₂O, pH 8,0) и нагревали в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Охлаждали раствор до 50-60°C и заливали в камеру для электрофореза, в которой предварительно устанавливали гребенку для формирования лунок. Для формирования геля оставляли его на 20-30 мин, затем камеру заполняли 1xТАЕ буфером (10 мл 50xТАЕ буфера, 490 мл H₂O) так, чтобы он слегка покрывал гель, и убирали гребенку. После проведения ПЦР 5 мкл амплификата разделяли в агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, при напряжении 150 В в течение нескольких минут для последующей визуализации в УФ-свете, подтверждающей наличие продукта амплификации. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Критерии предлагаемого способа диагностики ВИН у больных ТБ подобраны на основании анализа данных углубленного клинико-иммунологического обследования 338 больных с впервые выявленным распространенным деструктивным ТБ до назначения специфической химиотерапии и 118 условно здоровых добровольцев, соответствующих следующим критериям. Критерием включения в исследование было наличие у впервые выявленных больных инфильтративного, диссеминированного и фиброзно-кавернозного ТБ. В исследование не включались: больные, не желающие принимать участие в исследовании, больные, получавшие на момент исследования терапию противотуберкулезными, нестероидными противовоспалительными препаратами и глюкокортикостероидами; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкопатология, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми, в том числе аутоиммунными и аллергическими заболеваниями, инфицированные вирусами гепатита и ВИЧ; больные, которым применялась иммунотерапия. Включенные в исследование здоровые добровольцы были сопоставимы с больными ТБ по полу и возрасту, не имели в анамнезе хронических соматических (в том числе аутоиммунных) заболеваний и аллергических реакций.

После применения вышеуказанных критериев были сформированы три клинические группы больных с различными клиническими формами ТБ. Клиническую форму заболевания устанавливали на основании данных рентгенологического исследования легких. У всех обследованных пациентов отмечался распространенный (более 4 сегментов) деструктивный характер поражения легочной ткани с вовлечением в патологический процесс преимущественно обоих легких.

Инфильтративный туберкулез легких (ИТБ) был диагностирован у 209 пациентов и характеризовался на рентгенограмме наличием одной или нескольких неоднородных теней туберкулезного инфильтрата диаметром от 5 до 7 см с очагами распада и обсеменения.

Диссеминированный туберкулез (ДТБ) был выявлен у 89 больных, рентгенологическим признаком которого являлось наличие в одном или обоих легких мелких и средних очаговых изменений неоднородной структуры за счет инфильтрации и распада.

Диагноз фиброзно-кавернозного туберкулеза легких (ФКТБ) был выставлен 40 больным и характеризовался на рентгенограмме наличием нескольких кольцевидных теней более 2 см в диаметре чаще в субплевральных отделах, а также выраженным пневмофиброзом.

Возбудитель туберкулеза выявляли методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флуорохромов (аурамина). Бактериовыделение регистрировалось в 100% случаев заболевания. Для видовой идентификации микобактерий туберкулеза (МБТ) производили посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2.

Всем больным для установления наличия/отсутствия ВИН проводилось комплексное исследование параметров клеточного и гуморального иммунитета, а также иммуногенетического исследование.

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. Все количественные показатели проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных выборок вычисляли средневыворочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибку среднего (m). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (M), первый и третий квартили (Q_1, Q_3). Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число (n) и относительная частота встречаемости (%). При соответствии признака в исследуемых выборках нормальному закону распределения проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа.

Для оценки достоверности различий числовых характеристик выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали критерий Краскала-Уоллиса.

Для попарного сравнения показателей в исследуемых группах применяли критерий Манна-Уитни (для независимых групп) и критерий Вилкоксона (для зависимых групп). Различие показателей в сравниваемых группах считали статистически значимым при уровне значимости $p \leq 0,05$. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса.

Показатели клеточного иммунитета у больных ТБ и здоровых добровольцев, установленные в ходе проведенного исследования, суммированы в таблице 1. Представленные результаты свидетельствуют о выраженном дисбалансе в структуре субпопуляций регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов у больных ТБ. Продемонстрировано увеличение численности Foxp3-позитивных регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью и CD3⁺CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-лимфоцитов на фоне снижения числа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов, $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и CD45RO⁺ Т-клеток памяти у больных ТБ по сравнению с аналогичными показателями у здоровых добровольцев. Отметим, что указанные изменения наиболее выражены и случаях ДТБ и ФКТБ, которые всегда менее благоприятны с точки зрения как клинического течения заболевания, так и эффективности протективного иммунного ответа. Таким образом, у больных ТБ отмечается дисрегуляция клеточного звена иммунной системы с преобладанием числа субпопуляций Т-лимфоцитов, выполняющих супрессорные функции, что свидетельствует о неэффективности клеточных реакций и иммунологической недостаточности.

В таблице 2 представлены данные, характеризующие особенности цитокинопродукции *in vitro* у больных ТБ. В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что при туберкулезной инфекции дисбаланс цитокинопродукции связан с дефицитом секреции IL-2 («фактора роста» Т-клеток) на фоне гиперсекреции противовоспалительных цитокинов с иммуносупрессорной активностью: IL-4, IL-10 и TGF β . При этом данные изменения являются односторонними, как в случае базальной секреции цитокинов, так и при индукции клеточных культур вакцинным штаммом BCG. Это позволяет сделать вывод, что помимо увеличения количества клеток-супрессоров иммунного ответа у больных ТБ значительно повышена и их функциональная активность, поскольку регуляторные Т-клетки реализуют свои иммуносупрессорные эффекты преимущественно за счет продукции цитокинов-ингибиторов и, возможно, секвестрации IL-2 путем его связывания посредством рецептора к IL-2 (молекулы CD25) на поверхности клеток [3].

В ходе исследований нас интересовал также вопрос о предрасположенности обследованных нами больных ТБ к формированию иммунологической недостаточности осложняющей течение туберкулезной инфекции. Для решения этой задачи было проведено исследование полиморфных скитов генов цитокинов (Т-330G гена IL2 (rs2069762), С-590Т гена IL4 (rs2243250), С-592А гена IL10 (rs1800872), С-509Т гена TGF β (rs1800469)) и проанализировали взаимосвязь аллельного полиморфизма иммунорегуляторных генов с цитокинопродукцией *in vitro*. В таблицах 3 и 4 суммированы данные, полученные в ходе исследования особенностей функционального полиморфизма генов цитокинов. Установлено, что у больных ТБ как базальная, так и BCG-индуцированная гипосекреция IL-2 и гиперсекреция IL-4, IL-10 и TGF β обусловлены носительством «низко продуцирующего» аллеля G и генотипа GG (Т-330G) гена IL2 и «высоко продуцирующих» аллеля А и генотипа AA (С-592А) гена IL10, аллеля Т и генотипа ТТ (С-509Т) гена TGF β и аллеля Т и генотипа ТТ (С-590Т) гена IL4. Таким образом, у пациентов с ТБ иммунологическая недостаточность

является в том числе детерминированной носительством полиморфных вариантов иммунорегуляторных генов IL2, IL4, IL10 и TGFβ, так как избыток цитокинов с супрессорной активностью, несомненно, приводит к индукции, конверсии и генерации на периферии регуляторных Т-клеток, а недостаток IL-2 способствует угнетению клональной экспансии эффекторных Т-хелперов.

Примеры на осуществление способа

Пример 1. Больной Ф., 47 лет.

Диагноз: подострый диссеминированный туберкулез легких в фазе инфильтрации и распада, МБТ (+). Диагноз туберкулеза легких был установлен на основании анамнеза, клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

При поступлении на стационарное лечение в Томскую областную клиническую туберкулезную больницу 28.11.2011 г. параллельно с описываемыми далее обследованиями у больного Ф. был произведен забор крови для определения иммунологических и молекулярно-генетических параметров согласно предлагаемому способу. В результате обследования были получены следующие результаты.

Относительное содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток у больного Ф. составило 10,2%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток - 8,3%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток - 2,2%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных - 15,1%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов - 18%, γδТ-лимфоцитов - 1,5%, CD45R0⁺ Т-клеток памяти - 3,1%; содержание IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больного Ф. составило 12,0 пг/мл, IL-4 - 66,4 пг/мл, IL-10 - 47,8 пг/мл, TGFβ - 1756,7 пг/мл. При проведении молекулярно-генетического исследования у больного Ф. нами было установлено носительство аллеля G и генотипа GG (T330G) гена IL2, аллеля A и генотипа AA (C-592A) гена IL10, аллеля T и генотипа TT (C-509T) гена TGFβ и аллеля T и генотипа TT (C-590T) гена IL4. Таким образом, у больного Ф. была диагностирована вторичная иммунологическая недостаточность.

Дальнейшее обследование пациента позволило выявить следующие факты.

Объективный статус. Общее состояние ближе к удовлетворительному, t=37,8°C, положение активное, сознание ясное. Кожные покровы бледные, влажные. Периферические лимфоузлы не увеличены. Костно-мышечная система без видимых деформаций, движения в суставах в полном объеме.

При осмотре грудная клетка цилиндрическая. Частота дыхания составляет 14 в минуту, фаза вдоха удлинена. При пальпации грудной клетки болевые точки отсутствуют. При перкуссии перкуторный звук легочный, одинаковый над симметричными участками. Аускультативно определяется ослабленное дыхание с удлиненным вдохом, влажные низкие хрипы по передней и задней поверхности легких.

При осмотре области сердца видимых патологических изменений нет. ЧСС 82 в минуту, соответствует пульсу. Тоны сердца приглушены, ритмичные. АД 145/90 мм рт.ст., одинаковое на обеих руках.

При пальпации живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Пузырные симптомы отрицательные. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Дизурических явлений и периферических отеков нет.

Рентгенологически от 28.11.2011: в проекции верхних долей обоих легких на фоне обогащенного легочного рисунка множественные очаговые малой интенсивности, сливного характера тени, с участками просветления.

В анализе мокроты от 29.11.2011: МБТ обнаружены методом микроскопии и методом посева.

Общий анализ крови от 28.11.2011: гемоглобин - 102 г/л, количество эритроцитов - $2,21 \times 10^{12}/л$, цветовой показатель (ЦП) 0,5, общее количество лейкоцитов (ОКЛ) - $15,5 \times 10^9/л$, эозинофилы - 4%, палочкоядерные нейтрофилы - 12%, сегментоядерные нейтрофилы - 67%, лимфоциты - 13%, моноциты - 7%, СОЭ - 44 мм/ч.

Общий анализ мочи от 28.11.2011: без особенностей.

Биохимический анализ крови от 29.11.2011: общий белок - 59 г/л, АЛТ - 17 МЕ/л, АСТ - 24 МЕ/л, тимоловая проба - 4,8 ед, холестерин - 6,0 ммоль/л, общий билирубин - 11,9 мкмоль/л, глюкоза - 5,6 ммоль/л. Реакция Манту - 20 мм.

По поводу установленного и обоснованного диагноза (подострый диссеминированный туберкулез легких в фазе инфильтрации и распада, МБТ (+)) пациенту была назначена противотуберкулезная химиотерапия согласно стандартному режиму химиотерапии Пб, включающая в себя противотуберкулезные препараты резервного (2-го) ряда. Пациент Ф. получал указанное лечение в течение 2,5 недель, однако положительной динамики практически не отмечалось. В связи с этим пациенту была назначена консультация врача-иммунолога для назначения патогенетически обоснованной иммунокорректирующей терапии. С учетом данных, полученных в ходе иммунологического и иммуногенетического обследования, позволивших диагностировать у больного Ф. генетически детерминированную ВИН, врачом-иммунологом было назначено лечение, включающее в себя применение Т-активина, п/к, 1,0 мл, один раз в день в течение 10 дней, ликопида, per os, 10 мг, через день в течение 20 дней, ронколейкина, в/в капельно по 2,0 мл в 200 мл физиологического раствора, один раз в день в течение 10 дней. При этом лечение противотуберкулезными препаратами согласно стандартному режиму химиотерапии Пб было продолжено. Повторная консультация врача-иммунолога была назначена через 1,5 месяца.

В течение указанного времени у больного Ф. прослеживалась выраженная положительная динамика клинического течения заболевания. У пациента было проведено повторное обследование иммунологического статуса, за исключением молекулярно-генетических исследований, поскольку носительство полиморфных вариантов иммунорегуляторных генов, обуславливающее предрасположенность к развитию ВИН является этиологическим фактором, на который невозможно повлиять путем назначения иммунокорректоров. Данные иммунологического обследования

пациента Ф. от 10.02.2012 г.: относительное содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток у больного Ф. составило 4,1%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток - 5,22%, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток - 1,07%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных - 20,31%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов - 28,4%, $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов - 2,8%, CD45R0⁺ Т-клеток памяти - 5,1%; содержание IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больного Ф. составило 26,4 пг/мл, IL-4 - 48,7 пг/мл, IL-10 - 33,6 пг/мл, TGF β - 1210,5 пг/мл. Как показывают полученные данные, у больного Ф. отмечается тенденция к нормализации параметров иммунного статуса после диагностированной ВИН и проведения курса иммунокорректирующей терапии.

Приведенный пример наглядно иллюстрирует эффективность, информативность и высокую точность предложенного нами способа. Таким образом, разработанная модель диагностики вторичной иммунологической недостаточности у больных туберкулезом легких, основанная на оценке количественных показателей иммунного и иммуногенетического статуса пациента, позволяет своевременно диагностировать дефекты иммунной системы у больных туберкулезом легких при выявлении заболеваний и применять меры коррекции лечебного воздействия с использованием современных методов иммуномодулирующей терапии.

Приложение

Фиг.1 Гистограмма распределения мононуклеарных лейкоцитов по интенсивности прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценивается общее содержание лимфоцитов в смешанной суспензии мононуклеарных лейкоцитов

Фиг.2 Гистограмма распределения CD4⁺-лимфоцитов, меченных FITC, по интенсивности SSC-светорассеяния и флуоресценции по первому каналу FL1

Фиг.3. Гистограмма распределения регуляторных (Treg - T regulatory) CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в популяции CD4-позитивных лимфоцитов крови по интенсивности флуоресценции в FL2-, FL3-каналах (меченных PE и PE-Cy5). Оценивается содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток (правый верхний квадрант), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ клеток (левый верхний квадрант), CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ клеток (правый нижний квадрант).

Фиг.4. Гистограмма распределения CD4⁺CD25⁺ клеток в популяции CD3-позитивных лимфоцитов в крови по интенсивности флуоресценции в FL1-, FL2-каналах. Оценивается содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} клеток (правый верхний квадрант) и CD3⁺CD4⁺CD25^{lo} клеток (правый нижний квадрант)

Фиг.5. Гистограмма распределения лимфоцитов, меченных Anti-CD45R0-PE по интенсивности SSC и флуоресценции по второму каналу FL2. Оценивается содержание лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD45R0

Фиг.6. Гистограмма распределения лимфоцитов, меченных Anti- $\gamma\delta$ -TCR-PE по интенсивности SSC и флуоресценции по второму каналу FL2. Оценивается содержание лимфоцитов, презентующих $\gamma\delta$ -TCR

Табл.1. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток периферической крови у больных туберкулезом легких

Табл.2. Показатели продукции иммунорегуляторных цитокинов in vitro у больных туберкулезом легких

Табл.3. Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови при спонтанной (базальной) секреции (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от аллельных вариантов генов цитокинов

Табл.4. Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови при индукции вакцинным штаммом BCG (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от аллельных вариантов генов цитокинов

Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток периферической крови у больных туберкулезом легких (%), Ме (Q ₁ -Q ₃)							
Группы лиц	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	$\gamma\delta$ T	CD45R0 ⁺
Здоровые доноры	2,63	5,12	25,45	35,38	0,19	4,88	8,9
	(2,00-3,29)	(4,76-9,75)	(22,30-27,60)	(32,74-38,74)	(0,13-0,26)	(4,12-6,26)	(6,92-10,18)
Больные ИТБ	4,48	6,95	17,52	35,38	0,37	3,35	8,82
	(3,10-6,00)	(5,50-11,20)	(9,40-22,60)	(32,74-38,74)	(0,28-0,45)	(2,86-4,15)	(4,97-17,42)
	p ₁ =0,047		p ₁ =0,036		p ₁ =0,042	p ₁ =0,029	
Больные ДТБ	5,35	6,30	13,50	31,61	0,45	2,34	7,68
	(3,75-7,14)	(5,50-8,00)	(8,40-17,20)	(29,33-34,41)	(0,25-0,67)	(2,11-3,06)	(3,35-9,38)
	p ₁ =0,014		p ₁ =0,005	p ₁ =0,042	p ₁ =0,021	p ₁ =0,014	
Больные ФКТБ	4,80	8,50	19,50	25,46	0,26	1,72	3,64
	(3,20-6,00)	(4,20-11,50)	(13,40-24,30)	(21,38-32,86)	(0,22-0,38)	(1,20-2,21)	(1,73-9,83)
	p ₁ =0,045	p ₁ =0,049	p ₁ =0,038	p ₁ =0,029	p ₁ =0,042	p ₁ =0,012	p ₁ =0,041
			p ₂ =0,047	p ₂ =0,048	p ₂ =0,041	p ₂ =0,041	p ₂ =0,024
		p ₃ =0,049	p ₃ =0,035		p ₃ =0,044	p ₃ =0,018	

Примечание: p₁ - уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров, p₂ - у больных ИТБ, p₃ - у больных ДТБ

Показатели продукции иммунорегуляторных цитокинов in vitro у больных туберкулезом легких, Ме (Q ₁ -Q ₃)								
Группы лиц	Без индукции (базальная)				При индукции BCG			
	IL-2	IL-4	IL-10	TGF- β	IL-2	IL-4	IL-10	TGF- β
	22,26	39,98	25,29	1108,75	69,36	43,69	26,21	1087,80

Здоровые доноры	(10,82-30,18)	(21,14-55,04)	(13,50-33,56)	(929,80-1487,20)	(13,94-165,80)	(26,46-68,55)	(22,74-60,22)	(500,00-1412,60)
					$p_4=0,016$			
Больные ИТБ	19,35	42,45	52,29	1112,83	11,29	26,53	59,27	955,30
	(15,52-25,31)	(26,26-52,27)	(27,73-61,06)	(471,52-1279,10)	(7,36-21,31)	(19,53-42,67)	(42,63-65,18)	(317,46-1147,26)
			$p_1=0,017$		$p_1=0,018$	$p_1=0,039$	$p_1=0,004$	
					$p_4=0,031$	$p_4=0,047$		
Больные ДТБ	15,38	54,82	49,20	1227,72	26,55	59,72	26,63	712,70
	(11,90-41,52)	(39,71-78,20)	(31,43-52,17)	(751,30-1675,20)	(18,61-37,41)	(44,12-89,88)	(21,57-44,23)	(642,50-789,56)
		$p_1=0,042$	$p_1=0,042$	$p_1=0,018$	$p_1=0,023$	$p_1=0,012$	$p_2=0,003$	$p_1=0,037$
		$p_2=0,010$	$p_2=0,012$		$p_2=0,009$	$p_2=0,001$		$p_4=0,017$
Больные ФКТБ	9,54	64,28	35,30	1742,58	12,65	36,29	16,55	1431,62
	(5,23-16,59)	(34,62-73,17)	(18,37-35,27)	(934,55-2517,13)	(4,84-32,76)	(29,45-48,62)	(10,20-25,60)	(754,72-2461,17)
	$p_1=0,046$	$p_1=0,032$	$p_3=0,018$	$p_1=0,010$	$p_1=0,002$	$p_1=0,043$	$p_1=0,050$	$p_1=0,046$
	$p_2=0,002$	$p_2=0,048$		$p_2=0,008$	$p_3=0,031$	$p_2=0,042$	$p_2=0,012$	$p_2=0,049$
	$p_3=0,017$	$p_3=0,027$		$p_3=0,018$		$p_3=0,029$	$p_3=0,050$	$p_3=0,027$
					$p_4=0,036$		$p_4=0,047$	

Примечание. p_1 - уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p_2 - у больных ИТБ; p_3 - у больных ДТБ; p_4 - с базальным уровнем секреции.

Табл.3												
Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови при спонтанной (базальной) секреции (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от аллельных вариантов генов цитокинов, Me (Q ₁ -Q ₃)												
Аллельный вариант гена	IL-2			IL-4			IL-10			TGF-β		
	ТТ	TG	GG	CC	CT	ТТ	CC	CA	AA	CC	CT	ТТ
Здоровые доноры	30,32	14,67	12,16	21,15	42,12	53,12	8,11	23,84	38,30	838,20	934,20	1487,20
	(26,70-36,50)	(13,93-17,50)	(11,04-13,28)	(32,35)	(19,95-45,04)	(39,12-60,81)	(51,02-60,81)	(6,71-9,38)	(33,36-43,25)	(623,31-929,83)	(913,24-1000,00)	(1350,21-1726,00)
	$P_{TT/TG}<0,05$	$P_{TG/GG}<0,05$	$P_{TT/GG}<0,05$	$P_{CC/CT}<0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$	$P_{CCA/CA}<0,05$	$P_{CA/AA}<0,05$	$P_{CC/AA}<0,05$	$P_{CC/CT}<0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$
Больные ТБ	31,88	16,89	7,86	40,00	38,64	70,45	19,27	52,14	114,04	762,55	1197,13	2276,10
	(21,75-53,82)	(11,41-24,77)	(5,92-9,99)	(17,05-57,12)	(27,27-50,00)	(62,12-90,40)	(16,40-23,37)	(39,25-74,94)	(95,75-120,04)	(591,84-950,61)	(1013,11-1452,09)	(1913,2-2872,18)
	$p_1>0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$	$p_2>0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$
	$P_{TT/TG}<0,05$	$P_{TG/GG}<0,05$	$P_{TT/GG}<0,05$	$P_{CC/CT}>0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$	$P_{CCA/CA}<0,05$	$P_{CA/AA}>0,05$	$P_{CC/AA}<0,05$	$P_{CC/CT}<0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$
Примечание: здесь и в табл.4:												
$P_{TT/GG}$ - $P_{TG/GG}$ - $P_{TT/TG}$ - уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса T-330G гена IL-2.												
$P_{CC/CT}$ - $P_{CT/TT}$ - $P_{CC/TT}$ - уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса C-590T гена IL-4.												
$P_{CCA/CA}$ - $P_{CA/AA}$ - $P_{CC/AA}$ - уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса C-592A гена IL-10.												
$P_{CC/CT}$ - $P_{CT/TT}$ - $P_{CC/TT}$ - уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса C-509T гена TGFβ.												

Табл.4												
Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови при индукции вакцинным штаммом BCG (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от аллельных вариантов генов цитокинов, Me (Q ₁ -Q ₃)												
Аллельный вариант гена	IL-2			IL-4			IL-10			TGF-β		
	ТТ	TG	GG	CC	CT	ТТ	CC	CA	AA	CC	CT	ТТ
Здоровые доноры	72,83	115,20	27,87	43,40	59,76	61,12	18,40	23,07	40,04	1047,10	745,00	1087,80
	(28,65-159,00)	(63,49-151,70)	(11,78-43,97)	(20,74-62,12)	(55,29-76,67)	(59,03-78,15)	(7,11-20,22)	(20,22-35,37)	(35,11-44,98)	(907,80-1299,52)	(586,02-1164,53)	(1009,10-1087,87)
	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_3>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$	$p_2>0,05$
	$P_{TT/TG}<0,05$	$P_{TG/GG}<0,05$	$P_{TT/GG}<0,05$	$P_{CC/CT}>0,05$	$P_{CT/TT}>0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$	$P_{CCA/CA}<0,05$	$P_{CA/AA}>0,05$	$P_{CC/AA}<0,05$	$P_{CC/CT}>0,05$	$P_{CT/TT}>0,05$	$P_{CC/TT}>0,05$
Больные ТБ	25,59	20,35	14,80	40,00	40,00	68,18	23,71	65,73	104,15	875,16	1105,50	3051,40
	(15,60-37,87)	(11,41-32,46)	(13,62-20,09)	(22,73-59,09)	(22,20-56,82)	(45,49-100,01)	(22,21-33,36)	(37,26-120,00)	(64,66-119,00)	(623,77-939,84)	(734,51-1298,47)	(2423,37-3225,28)
	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1>0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1<0,05$	$p_1>0,05$	$p_1>0,05$	$p_1<0,05$
	$P_{TT/TG}>0,05$	$P_{TG/GG}>0,05$	$P_{TT/GG}>0,05$	$P_{CC/CT}>0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$	$P_{CCA/CA}<0,05$	$P_{CA/AA}>0,05$	$P_{CC/AA}<0,05$	$P_{CC/CT}>0,05$	$P_{CT/TT}<0,05$	$P_{CC/TT}<0,05$

Источники информации

- Orme I.M. Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors // *Future Microbiol.* 2011. V.6, No.2. P.161-177.
- Suppressor of cytokine signaling-3 is affected in T-cells from tuberculosis TB patients / M.Jacobsen, D.Repsilber, K.Kleinsteuber [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. V.17, No.9. P.1323-1331.
- Miyara M. and Sakaguchi S. Human FoxP3(+)/CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns // *Immunol. Cell. Biol.* 2011. V.89, No.3. P.346-351.
- Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
- Regulatory effect of complex of natural cytokines and antimicrobial peptides on murine macrophages infected with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis / L.V.Koval'chuk, I.V.Gvozdeva, L.N.Chcmousova [et al.] // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010. Vol.3. P.52-55.
- Wergeland I., Assmus J. and Dyrhol-Riise A.M. T regulatory cells and immune activation in Mycobacterium tuberculosis infection and the effect of preventive therapy // *Scand. J. Immunol.* 2011. Vol.73, No.3. P.234-242.
- Ho P., Wei X. and Seah G.T. Regulatory T cells induced by Mycobacterium chelonae sensitization influence murine responses to bacille Calmette-Guerin. // *J. Leukoc. Biol.* 2010. V.88, No.6. P.1073-1080.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: history and perspective // *Methods Mol Biol.* 2011. V.707. P.3-17.
- Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic scleroderma / S.Klein, C.C.Kretz, V.Ruland [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* 2011. V.70, No.8. P.1475-1481.
- CD28 and IL-4: two heavyweights controlling the balance between immunity and inflammation / T.Hünig, F.Lühder, K.Elflein [et al.] // *Med. Microbiol. Immunol.* 2010. Vol.199,

No.3. P.239-246.

11. Witherden D.A. and Havran W.L. Molecular aspects of epithelial $\gamma\delta$ T cell regulation // Trends. Immunol. 2011. V.32, No.6. P.265-271.

12. $\gamma\delta$ T cells response to Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis patients using preponderant complementary determinant region 3 sequence / X.Xi, X.Han, L.Li and Z.Zhao // Indian J Med Res. 2011. V.134, No.3. P.356-361.

13. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: физиология, патология, клиника. М.: Фолиант, 2011. 480 с.

14. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации / Д.Д.Абрамов, И.А.Кофиади, К.В.Уткин [и др.] // Иммунология. 2011. №5. С.275-280.

15. Полиморфизм генов цитокинов как один из факторов демографической структуры европеоидного населения Сибири / В.И.Коненков, В.Ф.Прокофьев, А.В.Шевченко [и др.] // Иммунология. 2011. №2. С.60-65.

16. Патент RU №2121302, опубликован 20.12.1998 «Способ прогнозирования туберкулезного процесса в легких», Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УО РАМН.

17. Патент RU №2129872, опубликован 10.05.1999 «Способ прогнозирования исходов иммунокорректирующей терапии вторичных иммунодефицитных состояний», Нестерова И.В., Дорошенкова А.Е.

18. Патент RU №2137129, опубликован 10.09.1999 «Способ диагностики вторичного иммунодефицита», Земсков А.М.

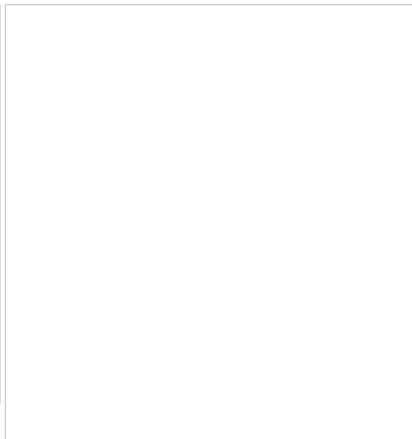
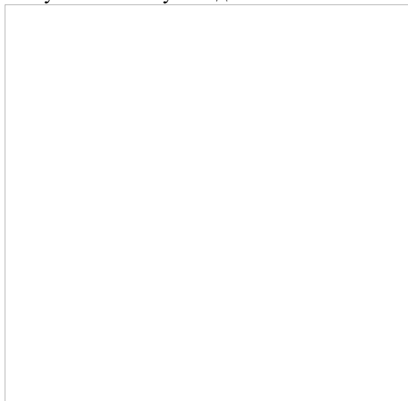
19. Патент WO 2009094212, 30.07.2009 «Diagnostic assay for detection of active tuberculosis», Horwits M.A., Harth G., Nag D. et al.

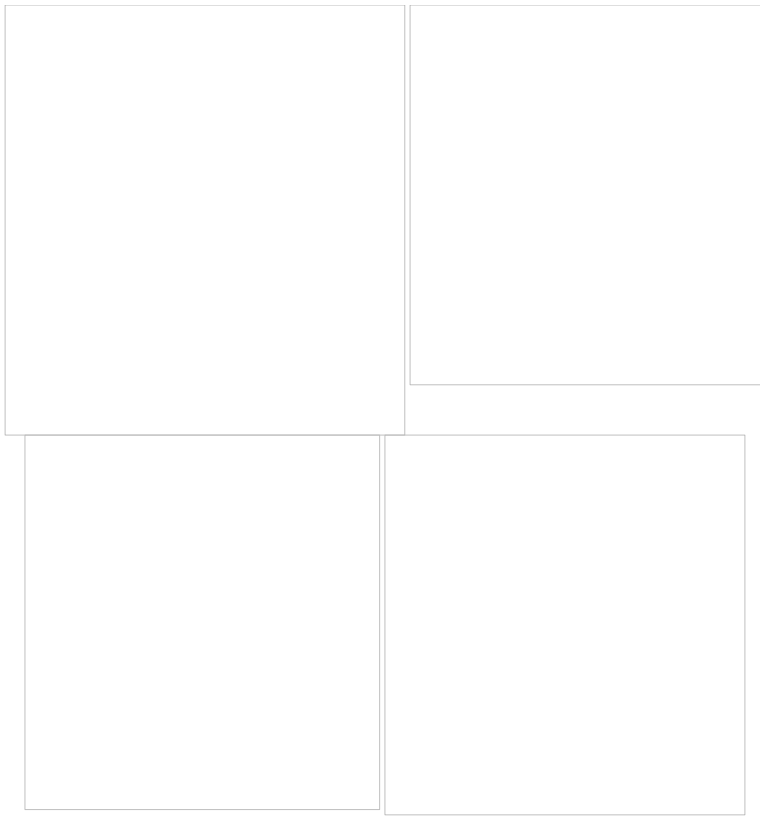
20. Патент WO 2004099771, 18.11.2004 «A new specific epitope based immunological diagnosis of tuberculosis», Andersen P., Brock I., Weldingh K.

21. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфическая ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой // Генетика. 2006. Т.42, №1. С.22-32.

Формула изобретения

Способ диагностики вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких, характеризующийся тем, что до назначения специфической химиотерапии проводят иммунологическое исследование периферической крови больных туберкулезом легких и определяют клеточные, гуморальные и молекулярно-генетические параметры иммунного статуса пациента, определяют количество $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов, $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных, $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ и $CD3^+CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-клеток, секрецию in vitro IL-2, IL-4, IL-10, TGF β и аллельные варианты генов иммунорегуляторных цитокинов IL2, IL4, IL10, TGF β и при относительном содержании в периферической крови $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток более чем 2,6%, $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток более чем 5,1%, $CD3^+CD4^+CD25^+$ регуляторных Т-клеток более чем 0,2%, $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток/Т-хелперов активированных менее чем 25,5%, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов менее чем 35,4%, $\gamma\delta$ T-лимфоцитов менее чем 4,9%, $CD45R0^+$ Т-клеток памяти менее чем 8,9%; содержания IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов периферической крови менее чем 22,3 пг/мл, IL-4 - более чем 40,0 пг/мл, IL-10 - более чем 25,3 пг/мл, TGF β - более чем 1109,0 пг/мл одновременно с носительством аллеля G и генотипа GG Т-330G гена IL2 и аллеля A и генотипа AA С-592A гена IL10, аллеля T и генотипа TT С-509T гена TGF β и аллеля T и генотипа TT С-590T гена IL4 диагностируют вторичную иммунологическую недостаточность.





ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А. Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **21.08.2018**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **12.07.2019**

Дата публикации и номер бюллетеня: [12.07.2019](#) Бюл. №20