

На правах рукописи

Колосова Анна Евгеньевна

**ФАКТОРЫ СУПРЕССИИ ИММУННОГО ОТВЕТА
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАМН,
заслуженный деятель науки РФ

**Новицкий
Вячеслав Викторович**

доктор медицинских наук,
профессор

**Уразова
Ольга Ивановна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

**Агафонов
Владимир Иванович**

доктор медицинских наук,
профессор

**Кологривова
Елена Николаевна**

Ведущая организация: ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (630051, Россия, г. Новосибирск, ул. Репина, 2)

Защита состоится «___» _____ 2011 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время отмечается выраженная тенденция к росту числа распространенных деструктивных форм туберкулезной инфекции, характеризующихся тяжелым течением, склонностью к формированию лекарственной резистентности к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) и высоким процентом летальных исходов [Филинук О.В., 2011; Jeon D.S. et al., 2011; Wells C.D., 2010]. Развитие и прогрессирующее течение туберкулеза во многом связывают с дефектом антигенспецифического иммунного ответа [Orme I.M., 2011; Jacobsen M. et al., 2010; Гунтупова Л.Д. и соавт., 2007; Кноринг Б.Е. и соавт., 1993].

В последние годы при исследовании иммунопатогенеза инфекционных заболеваний, в том числе туберкулезной инфекции, особое внимание уделяется регуляторным Т-клеткам, обладающим супрессорной активностью и тем самым способствующим снижению интенсивности антигенспецифического иммунного ответа, направленного на элиминацию патогенов различной природы [Koval'chuk L.V. et al., 2010; Chen X. et al., 2007; Guyot-Revol V. et al., 2006; Сахно Л.В. и соавт., 2004]. Предполагается, что опосредованное регуляторными Т-клетками угнетение пролиферации и дифференцировки Th1-лимфоцитов лежит в основе формирования туберкулиновой анергии у больных туберкулезом легких [Wergeland I. et al., 2011; Но Р. et al., 2010; Geffner L. et al., 2009; Сахно Л.В. и соавт., 2004; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001]. Сведения о роли регуляторных Т-лимфоцитов в патогенезе различных заболеваний немногочисленны. Регуляторные Т-клетки отличаются многообразием их типов, однако конкретные механизмы, с помощью которых они реализуют свои иммуносупрессорные эффекты, по-прежнему, остаются неустановленными. Между тем известно, что Т-лимфоциты с иммунофенотипом $CD4^+CD25^+$, содержащие внутриклеточный маркер Foxp3⁺ (Трег-клетки), отличаются от Th1-, Th2-, Th17-, Th-активированных клеток по спектру продуцируемых цитокинов и способны супрессировать функции всех перечисленных клонов Т-хелперов, а также обеспечивать доминантную иммунологическую толерантность к собственным антигенам [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Lee D.C. et al., 2010].

Конверсия, индукция Трег-клеток и реализация ими супрессорных свойств опосредуются главным образом иммунорегуляторными цитокинами – интерлейкином (IL)-2, IL-4, IL-10, трансформирующим фактором роста (TGF) β . Допускается возможность прямого действия Трег-лимфоцитов на клетки-мишени посредством конкурентного ингибирования костимулирующих молекул группы B7 (CD80, CD86) с

участием негативного активатора CTLA-4 (CD152) [Hünig T. et al., 2010; Wu Y.E. et al., 2010; Sharma P.K. et al., 2009; Roberts T. et al., 2007; Sharabi A. et al., 2006; Toure N.O. et al., 2005].

В последнее время рассматривается вопрос о роли $\alpha 2$ -макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) в качестве универсального модулятора действия цитокинов. Как известно, многие цитокины имеют рецепторы на поверхности клеток, через которые реализуются их регуляторные потенции, однако существенная часть цитокинов образует комплексы с $\alpha 2$ -МГ и поступает в клетки через рецепторы данного белка. $\alpha 2$ -МГ рассматривается также как акцептор избытка циркулирующих цитокинов и, наряду с этим, как фактор, управляющий пролиферацией иммунокомпетентных клеток. В частности продемонстрирована регулирующая (посредством фиксации TGF- β) роль $\alpha 2$ -МГ в отношении перехода хронической воспалительной реакции в острую при аутоиммунных заболеваниях [Lindner I. et al., 2010; Зорин Н.А. и соавт., 2006; Герасимов А.М. и соавт., 2003; Мазуров В.И. и соавт., 2002; Lauer D. et al., 2002].

Подводя итог, следует отметить, что понимание роли иммуносупрессорных механизмов, в том числе регуляторных Т-клеток и реализуемых ими потенций в развитии иммунопатологических реакций при туберкулезной инфекции позволит не только вскрыть новые фундаментальные механизмы иммунопатогенеза, но и разработать новые подходы к иммунокоррекции и профилактике иммуноопосредованных осложнений при туберкулезе.

Цель исследования: определить факторы супрессии антигенспецифического иммунного ответа при туберкулезе легких.

Задачи исследования:

1. Оценить реакцию Манту у больных инфильтративным, диссеминированным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких в связи с чувствительностью *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам.
2. Установить особенности субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток и секреции *in vitro* цитокинов с противовоспалительной и иммуносупрессорной активностью (IL-4, IL-10, TGF- β) у больных инфильтративным, диссеминированным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких в зависимости от характера реакции Манту и устойчивости возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам.
3. На основе результатов оценки субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток, концентрации $\alpha 2$ -макроглобулина в крови, базальной и антигениндуцированной цитокинопродукции (IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β) и пролиферации лимфоцитов *in vitro*

определить патогенетические факторы супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение факторов супрессии антигенспецифического иммунного ответа при различных клинических формах впервые выявленного распространенного деструктивного туберкулеза легких в зависимости от реакции на внутрикожное введение туберкулина (проба Манту) и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам до начала специфической химиотерапии. Продемонстрировано, что туберкулиновая анергия сопряжена с лекарственной резистентностью *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам. Показано, что увеличение количества Foxp3-позитивных CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью при туберкулезе легких у больных с положительной и отрицательной реакцией Манту ассоциируется со снижением числа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Т-лимфоцитов в крови и гиперсекрецией цитокинов с противовоспалительной и иммуносупрессорной активностью (IL-4, IL-10, TGF-β). Установлено, что увеличение содержания CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) и CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток в крови и продукции IL-10 и TGF-β наиболее выражено при лекарственно-резистентном фиброзно-кавернозном туберкулезе легких. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что иммуносупрессия при туберкулезе легких опосредована повышением содержания Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg) и α2-макроглобулина в крови, гиперпродукцией IL-4, IL-10 и TGF-β на фоне дефицита секреции IL-2 *in vitro*, ассоциированного с лимфоцитопенией и подавлением пролиферативной реакции лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигеном. При этом ведущую роль в цитокиноопосредованной иммуносупрессии при инфильтративном туберкулезе легких играет гиперсекреция IL-10, при диссеминированном – IL-4 и TGF-β, в то время как при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких отмечается сочетанное повышение базальной и VCG-индуцированной продукции IL-10 и TGF-β *in vitro*.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные новые данные значительно расширяют представления об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, вносят существенный вклад в понимание механизмов формирования супрессии иммунного ответа у больных с распространенным деструктивным туберкулезом легких. Результаты исследования теоретически обосновывают необходимость включения в стандартную программу лечения больных туберкулезом легких мероприятий по иммунокоррекции, направленной на регуляцию иммунного ответа в аспекте

инактивации выявленных факторов иммуносупрессии. Полученные данные могут быть положены в основу разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения туберкулеза легких, что наиболее значимо у пациентов с туберкулиновой анергией и множественной лекарственной резистентностью (особенно в случае фиброзно-кавернозной формы заболевания).

Основные положения и выводы диссертации используются в учебном процессе на лечебном и педиатрическом факультетах ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России на кафедрах патофизиологии (в тематических разделах «Патофизиология клетки», «Патофизиология иммунитета») и фтизиатрии и пульмонологии (в тематическом разделе «Иммунитет и аллергия при туберкулезе»).

Исследования проведены при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК №02.512.11.2112 «Молекулярно-генетические основы управления адаптационной реактивностью системы крови человека при инфекции» (руководитель – академик РАМН В.В. Новицкий); ГК №16.512.11.2046 «Разработка комплекса молекулярно-генетических маркеров дисрегуляции иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* для оптимизации диагностики и коррекции вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких» (руководитель – профессор О.И. Уразова)).

Положения, выносимые на защиту:

1. Туберкулиновая анергия, опосредованная активацией факторов супрессии антигенспецифического иммунного ответа, у больных диссеминированным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких связана с лекарственной резистентностью к основным противотуберкулезным препаратам.
2. Увеличение количества Foxp3-позитивных CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ регуляторных Т-клеток при туберкулезе легких у больных с положительной и отрицательной реакцией Манту сопряжено со снижением числа CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Т-лимфоцитов в крови и гиперсекрецией цитокинов с противовоспалительной и иммуносупрессорной активностью – IL-10 при инфильтративной (лекарственно-чувствительной), IL-4 и TGF-β при диссеминированной (лекарственно-резистентной) и IL-10, TGF-β при фиброзно-кавернозной (лекарственно-резистентной) формах заболевания.
3. Иммуносупрессия при туберкулезе легких обусловлена повышением содержания Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток (Treg), α2-макроглобулина в крови на фоне дефицита

продукции IL-2, ассоциированного с лимфоцитопенией, гипоэргической реакцией пролиферации лимфоцитов на стимуляцию антигеном и гиперсекрецией IL-4, IL-10, TGF- β *in vitro*. Данные изменения более значимы у больных с отрицательной, чем с положительной пробой Манту.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на конференциях молодых учёных «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2009» (Санкт-Петербург, 2009) и «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2010), Internationaler congress and fachmesse (Hannover, 2008), VIII Международной Российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции» (Новосибирск, 2009), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2010), XI конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2010), а также на научно-образовательных семинарах «Патофизиология системы крови и иммунитета» при Центре компетенции по проблеме инфекционных болезней им. И.И. Мечникова и Р. Коха ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объём и структура работы. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 4 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель включает 265 источников, из которых 120 отечественных и 145 зарубежных авторов.

Личное участие автора. Анализ литературных данных по теме диссертации, планирование исследования, постановка цели и задач исследования, пробоподготовка и консервация супернатантов культуральных суспензий клеток, иммуноферментный анализ, оценка пролиферативной активности лимфоцитов, определение концентрации $\alpha 2$ -макроглобулина в сыворотке крови, статистический анализ результатов, написание диссертации выполнены лично автором.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу данной работы положены результаты обследования 140 впервые выявленных больных (105 мужчин и 35 женщин в возрасте от 18 до 55 лет) с

распространенными деструктивными формами туберкулеза легких (ТЛ): 75 (53 мужчины и 22 женщины) с инфильтративным ТЛ (ИТЛ), 41 (33 мужчины и 8 женщин) с диссеминированным ТЛ (ДТЛ), 24 (19 мужчин и 5 женщин) с фиброзно-кавернозным ТЛ (ФКТЛ). Пациенты находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице (гл. врач – к.м.н. Г.В. Янова) во физиотерапевтическом отделении №1 (и.о. зав. отд. – Е.П. Степанова).

Клинический осмотр пациентов, сбор анамнеза, физикальные методы обследования больных и постановку диагноза осуществляли врачи-фтизиатры Томской областной туберкулезной клинической больницы: к.м.н. Филинюк О.В., к.м.н. Некрасов Е.В., к.м.н. Петрова Л.Е., Степанова Е.П., Мельникова Т.И., Янов А.А., Щегерцов Д.А.

Диагноз устанавливался на основании клинической картины заболевания, данных рентгенологического исследования легких, результатов микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

Всем обследованным проводилось внутрикожное введение туберкулина (проба Манту) в объеме 0,1 мл раствора, содержащего 2 туберкулиновых единицы (ТЕ). Результат пробы Манту оценивали через 72 ч путем измерения размера инфильтрата (папулы) в миллиметрах (мм). При отсутствии инфильтрата при учете реакции на пробу Манту измеряли и регистрировали гиперемию. Результат пробы Манту считали: отрицательным при полном отсутствии инфильтрата (папулы) или гиперемии, или при наличии уколочной реакции (0-1 мм); сомнительным при инфильтрате размером 2-4 мм или только гиперемии любого размера без инфильтрата; положительным при наличии инфильтрата диаметром 5 мм и более. Гиперергическими у взрослых считались реакции с диаметром инфильтрата 21 мм и более, а также везикуло-некротические реакции независимо от размера инфильтрата с лимфангоитом или без него.

В основу деления больных с различными клиническими формами легочного туберкулеза на группы были положены два принципа: лекарственная чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) и различная реакция на внутрикожное введение туберкулина. Согласно первому принципу больные были распределены на две группы: первую группу больных, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ), чувствительные к основным ПТП, составили 43 пациента с ИТЛ, 24 с ДТЛ и 11 с ФКТЛ; во вторую группу были включены больные, выделяющие МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу): 32 пациента с ИТЛ, 17 с ДТЛ и 13 с ФКТЛ.

В соответствии со вторым принципом все больные были разделены на группы с

положительной (положительной и гиперергической) и с отрицательной (отрицательной и сомнительной) реакцией на туберкулин.

Лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* определяли традиционным методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Исследования проводились в бактериологических лабораториях Томской областной туберкулезной клинической больницы и Томского областного противотуберкулезного диспансера.

Критериями исключения больных ТЛ из исследования служили возраст менее 18 или более 55 лет, проведение вакцинации или ревакцинации BCG (в течение менее 3 лет до момента начала исследования) и другими вакцинами, недавно (менее 3 месяцев назад) перенесенная инфекция, острые и хронические (в стадии обострения) сопутствующие инфекционные и соматические заболевания, аллергические состояния.

Контрольную группу составили 28 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая из локтевой вены утром натощак в количестве 10 мл. Исследование иммунологических показателей у больных ТЛ проводили однократно, до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Клетки культивировали по методу Е.Д. Гольдберга и соавт. [1992]. Для индукции секреторной функции мононуклеарных лейкоцитов в клеточные культуры вносили вакцинный штамм BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) (ФГУП «НПО Микроген», Россия) в дозе 50 мкг/мл, для индукции пролиферации лимфоцитов – туберкулин (PPD, 50 ТЕ). Определение содержания интерлейкинов (IL) -2, -4, -10 и трансформирующего фактора роста (TGF) β в супернатантах культуральных суспензий проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкциям, прилагаемым производителями тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; ООО «Цитокин», Россия; ООО «Протеиновый контур», Россия; «Biosource», Бельгия). Результаты выражали в пг/мл. Для определения концентрации α 2-макроглобулина (α 2-МГ) в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA), анализ проводили согласно инструкции предлагаемой фирмой IMMUNDIAGNOSTIK AG (Германия). Субпопуляции $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток определяли методом проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентными метками. Процедуру окрашивания поверхностных ($CD4$,

CD25) и внутриклеточного (Foxp3) маркеров проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США). Измерение производили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD Cell Quest for Mac OS® X. Пролиферацию лимфоцитов оценивали с помощью МТТ-теста [Carmichael J., 1987]. Результаты теста выражали в единицах оптической плотности (ед.опт.пл).

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Для представления количественных показателей рассчитывали медиану (M), первый и третий квартили (Q₁, Q₃). Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения (критерий Шапиро-Уилкса). Для оценки достоверности различий выборочных данных, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Вилкоксона для зависимых выборок и U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число и относительная величина в процентах (%). Статистическую значимость различий качественных признаков, относящихся к номинальным данным, проверяли с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Для анализа связи между качественными признаками использовался коэффициент ассоциации r_a [Боровиков В.П., 2003; Гланц С., 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что в основе иммунопатогенеза различных клинических форм туберкулеза легких (ТЛ) лежат неоднозначные механизмы иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*. С иммунологической точки зрения туберкулез является классическим примером иммунопатологической реакции гиперчувствительности замедленного (IV) типа, т.е. клеточноопосредованного иммунного ответа. Однако в зависимости от характера течения туберкулезного процесса выделяют несколько форм специфического иммунного ответа, при этом для инфильтративного ТЛ (ИТЛ), как правило, характерен Th1-ответ. В случае диссеминированного ТЛ (ДТЛ) преобладает Th2-ответ. Что же касается фиброзно-кавернозного ТЛ (ФКТЛ), то у таких пациентов практически всегда специфический иммунный ответ выражен слабо (Т-клеточная

анергия), но возможен и другой вариант, когда при ФКТЛ задействованы оба типа иммунного ответа с преобладанием Th2, что характеризуется усиленной антителопродукцией, массивной бактериемией и, как следствие, деструкцией легочной ткани и казеозным некрозом [Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008; Комогорова Е.Э. и соавт., 2005; Хоменко А.Г., 1996].

Проведенные нами исследования позволили установить небезынтересные факты в отношении групп больных ТЛ с отрицательной реакцией Манту, т.е. с туберкулиновой анергией. С позиции иммунологии анергией (иммунологической толерантностью) принято считать полную или частичную утрату организмом специфической иммунологической реактивности на антигенную стимуляцию. При анергии отмечается отсутствие или снижение пролиферативного ответа различных клонов CD4⁺ Т-хелперов на специфические антигены и митогены как *in vitro*, так и *in vivo* [Тюлькова Т.Е. и соавт., 2008]. В данном случае целесообразно говорить о Т-клеточной анергии. У пациентов с ТЛ она часто ассоциирована с отрицательной реакцией на внутрикожное введение туберкулина [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Черных Е.Р. и соавт., 2002]. В то же время следует отметить, что отрицательная реакция Манту у обследованных нами больных ТЛ в 19,28% случаев сопровождалась лекарственной устойчивостью (ЛУ) к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП). При оценке связи между наличием лекарственной резистентности и характером пробы Манту нами было установлено наличие данной ассоциации у больных ДТЛ ($\chi^2=6,31$, $p<0,05$) и ФКТЛ ($\chi^2=11,10$, $p<0,01$). При этом среди больных ДТЛ и ФКТЛ доля пациентов с лекарственно-резистентным вариантом заболевания и отрицательной реакцией Манту составляла 26,83% и 54,18% соответственно. В этой связи можно думать, что штаммы микобактерий, устойчивые к стандартной химиотерапии, обладают определенными свойствами в отношении реализации механизмов супрессии иммунного ответа, возможно, посредством индукции Т-клеточной анергии [Воронкова О.В. и соавт., 2011; Сахно Л.В. и соавт., 2004].

Общеизвестно, что ключевыми клетками иммунной системы, обеспечивающими формирование специфического и неспецифического ответа организма на внедрение инфектогена (в частности МБТ), а также участвующими в реализации механизмов иммунной супрессии, являются лимфоциты крови. Изменения показателей количества лимфоцитов в крови достоверно отражают состояние основной защитной системы организма и являются основой для диагностики и оценки тяжести течения инфекционного процесса [Карпова М.Р., 2000].

При оценке результатов проведенных исследований у больных ТЛ вне зависимости от формы заболевания, характера туберкулиновой реакции и чувствительности возбудителя к ПТП в острую фазу заболевания была установлена характерная для туберкулезной инфекции относительная лимфоцитопения. Более выраженное снижение как относительного, так и абсолютного числа лимфоцитов было выявлено у больных ТЛ с отрицательной (чем с положительной) реакцией Манту вне зависимости от клинической формы специфического процесса.

Одной из важных причин снижения численности лимфоцитов при инфекции, как известно, может служить угнетение их пролиферации. Как показали результаты проведенного нами исследования, у больных как лекарственно-чувствительным (ЛЧ), так и лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТЛ вне зависимости от клинической формы заболевания в острый период регистрировалось выраженное снижение активности спонтанной бласттрансформации клеток относительно нормы. Помимо спонтанной пролиферации лимфоцитов, которая отражает общую реакцию лимфоидных элементов периферической крови на инфекцию, нами была оценена индуцированная реакция пролиферации, которая свидетельствует о резервной реактивности Т- и В-лимфоцитов. При этом отражением функционального состояния лимфоцитов, коммитированных на микобактериальные антигены, является пролиферативный ответ этих клеток на добавление в клеточные культуры специфического микобактериального антигена – туберкулина (PPD).

При действии туберкулина в дозе 50 ТЕ уровень пролиферации лимфоцитов у пациентов с ТЛ достоверно не отличался от показателей спонтанной пролиферации, но был существенно ниже нормы. При этом наименьший уровень пролиферативного PPD-ответа лимфоцитов регистрировался при лекарственно-чувствительном ФКТЛ (0,118 ед. опт. пл. при норме 0,321 ед. опт. пл., $p=0,001$).

Таким образом, отсутствие пролиферативного ответа клеток на PPD при ТЛ свидетельствует об анергии специфичных к микобактериальному антигену лимфоцитов, возможно, вследствие иммуносупрессии или функционального истощения клеток в процессе формирующейся при ТЛ реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Приоритет в модуляции реакций пролиферации, дифференцировки и функциональной активности лимфоцитарных клеток, безусловно, принадлежит регуляторным иммуноцитокинам. Одним из них является интерлейкин (IL) 4 – типичный цитокин с плеiotропной активностью [Симбирцев А.С., 2004, 1998]. При взаимодействии IL-4 со специфическим рецептором осуществляется широкий спектр

иммунологических функций: поляризация дифференцировки Т-лимфоцитов в направлении Th типа 2, активация В-лимфоцитов, переключение синтеза иммуноглобулинов [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Наряду с этим, IL-4 предотвращает апоптоз регуляторных Т-клеток (Treg-лимфоцитов), усиливает их пролиферацию и повышает супрессорную активность [Rase L. et al., 2005], ингибирует продукцию Th1-ассоциированных цитокинов (IL-2 и интерферона (IFN) γ) [Pritchard D. I. et al., 2004].

Проведенное нами исследование выявило повышение продукции IL-4 *in vitro* у больных ДТЛ вне зависимости от реакции на внутрикожное введение туберкулина (до 47,73 пг/мл при положительной и 65,91 пг/мл при отрицательной пробе Манту при норме 39,98 пг/мл, $p < 0,05$), а также (в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП) при лекарственно-устойчивом ДТЛ (61,36 пг/мл, $p < 0,05$).

Для оценки индуцированной секреции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови в качестве антигена использовался вакцинный штамм BCG (живой аттенуированный штамм *M. bovis*). Анализ BCG-индуцированной продукции IL-4 *in vitro* показал, что наиболее выраженные изменения данного параметра также отмечались в группе больных ДТЛ, у которых вне зависимости от реакции на туберкулин продукция указанного медиатора превышала контрольные значения, а у туберкулинположительных пациентов – и базальный уровень продукции IL-4.

На наш взгляд, это связано с тем, что при ДТЛ (как указывалось выше) реализуется преимущественно специфический Th2-ответ. С точки зрения иммунопатологии ДТЛ можно отнести к ареактивной форме, для которой характерно резкое снижение функциональной активности Т-лимфоцитов, моно- и полиморфноядерных лейкоцитов, усиление метаболизма В-лимфоцитов и их иммуноглобулинсекретирующей функции [Хоменко А.Г., 1996; Комогорова Е.Э. и соавт., 2005]. Логично предположить, что в иммунных реакциях при ТЛ IL-4 выступает преимущественно как синергист IL-10, соответственно он выполняет свою функциональную роль как активатор Th2-иммунного ответа с гиперпродукцией противотуберкулезных антител. Корреляционный анализ позволил установить наличие положительной взаимосвязи между секрецией указанных иммуноцитокинов при ДТЛ ($r = 0,7$, $p < 0,001$).

Наряду с IL-4 важную роль в формировании противотуберкулезного иммунитета играет IL-2 – ростовой фактор Т-клеток. Анализ IL-2-секретирующей функции мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* у больных ТЛ с различной чувствительностью возбудителя к ПТП (ЛЧТЛ и ЛУТЛ) показал, что в группе больных с

диссеминированным и фиброзно-кавернозным ЛУТЛ дефицит образования ИЛ-2 (14,26 пг/мл и 8,62 пг/мл соответственно при норме 22,26 пг/мл) был более выраженным, чем при аналогичных клинических формах ЛЧТЛ ($p < 0,05$). Также в ходе проведенного исследования было выявлено снижение базальной продукции ИЛ-2 *in vitro* (относительно таковой у здоровых доноров) у туберкулинположительных пациентов с ИТЛ и при ФКТЛ вне зависимости от реакции Манту. Однако наиболее выраженный дефицит базальной продукции ИЛ-2 отмечался в группе туберкулинотрицательных больных ФКТЛ (6,74 пг/мл, $p < 0,05$).

Таким образом, выявленные нами лимфоцитопения и снижение пролиферативной активности лимфоцитов у больных ТЛ могли обуславливаться гипопродукцией ИЛ-2 – основного эндогенного фактора митогенеза лимфоцитов, что подтверждается положительной корреляционной связью между уровнем продукции ИЛ-2 *in vitro* и относительным количеством лимфоцитов в крови ($r = 0,7$, $p < 0,05$) при ИТЛ и ДТЛ.

Анализ ВСГ-индуцированной секреции ИЛ-2 *in vitro* при ЛЧТЛ и ЛУТЛ также показал ее угнетение у всех больных ТЛ вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП и реакции Манту по сравнению с группой здоровых доноров. При этом наиболее выраженным оно было у туберкулинотрицательных больных с ИТЛ (5,48 пг/мл, $p < 0,05$) и ФКТЛ (1,72 пг/мл, $p < 0,01$).

Однако уникальная роль ИЛ-2 в регуляции иммунитета связана не только с выполнением функции ростового фактора, но и с контролем за гиперактивацией иммунной системы за счет стимуляции и дифференцировки регуляторных Т-клеток с иммуносупрессорной активностью [Chen X. et al., 2007; Сахно Л.В. и соавт., 2004; Malek T., Waeger A., 2004]. Выделяют как минимум две разновидности Трег-клеток: естественные тимические регуляторные Т-клетки ($\gamma\delta$ T, NKT, Treg) и индуцированные на периферии (Treg, Th1, Th3, $CD8^+CD28^-$) [Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Предполагается, что естественные Трег-клетки имеют фенотип $CD4^+CD25^{(hi)}Foxp3^+$, в то время как к индуцированным $CD4^+$ регуляторным Т-клеткам относятся преимущественно лимфоциты с иммунофенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, а также $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ – гетерогенная субпопуляция Т-лимфоцитов, включающая в себя как регуляторные Т-клетки, так и активированные $CD4^+$ Т-лимфоциты. При этом супрессорной активностью обладают только Foxp3-экспрессирующие Т-клетки [Ярилин А.А., Донецкова А.Д., 2006; Pop S.M. et al., 2005], т.е. $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ и $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ Т-лимфоциты.

Как показали проведенные исследования, у больных ИТЛ и ДТЛ вне зависимости

от реакции Манту и лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП до начала специфической терапии, т.е. в острую фазу воспалительного процесса, отмечалось увеличение количества $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Трег-лимфоцитов в крови. Схожая картина наблюдалась при лекарственно-устойчивом варианте ФКТЛ и у больных ФКТЛ с положительной пробой Манту (табл. 1).

По-видимому, увеличение числа $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в крови является неблагоприятным фактором, поскольку в данной ситуации может увеличиваться их функциональная активность, способствующая в дальнейшем формированию как туберкулиновой, так и Т-клеточной анергии. Кроме того, увеличение числа $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ клеток в крови практически при всех клинических формах ТЛ позволяет предположить, что именно они могут выполнять одну из основных иммуносупрессорных функций при туберкулезной инфекции.

Известно, что Трег-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ «обучаются» в тимусе на этапе негативной селекции и покидают тимус как популяция естественных Трег (Trn), обладающих максимальной супрессорной активностью. Источником $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т-клеток могут быть $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ Т-лимфоциты, также формирующиеся в тимусе и образующие резервный пул для генерации $CD25^+$ Трег-лимфоцитов [Zelenay A.C. et al., 2005]. В свою очередь, регуляторные Т-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ в связи с отсутствием экспрессии на их поверхности CD25-маркера принято считать индуцированными, т.е. генерированными на периферии под воздействием TGF- β [Wu Y.E. et al., 2010; Pop S. et al., 2005; Setoguchi R. et al., 2005].

При оценке количества Трег-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ у туберкулиноотрицательных больных с ДТЛ и ФКТЛ отмечалось увеличение их количества по сравнению с таковым у здоровых доноров. При этом у больных с положительной реакцией на туберкулин значения данного параметра были ниже таковых у больных с отрицательной реакцией Манту вне зависимости от формы ТЛ (табл. 1), что может быть связано со способностью индуцированных Трег влиять на формирование туберкулиновой анергии.

Также нами было отмечено достоверное увеличение данной субпопуляции Трег-клеток у больных с ЛУТЛ по сравнению с нормой и лекарственно-чувствительным вариантом заболевания при ИТЛ и ФКТЛ. Таким образом, нельзя исключить тот факт, что при ЛУТЛ происходит активация механизмов иммуносупрессии как за счет естественных, так и за счет индуцированных Трег. С другой стороны, ЛУ-штаммы МБТ могут способствовать угнетению иммунного ответа посредством индукции Трег-клеток.

Таблица 1

Субпопуляционный состав Т-регуляторных лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких в зависимости от результатов пробы Манту (Ме (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁻ FoxP3 ⁺ (%)
Здоровые доноры		25,45 (22,30-27,60)	2,63 (2,00-3,29)	5,00 (4,76-10,00)
Больные инfiltrативным туберкулезом легких (ИТЛ)	Отрицательная проба Манту	18,00 (13,00-19,00)	5,00 (3,50-6,50) p ₁ =0,040	8,00 (7,00-9,00) p ₁ =0,020
	Положительная проба Манту	17,00 (9,00-26,00) p ₁ =0,026	4,00 (3,00-8,00) p ₁ =0,007	6,00 (4,00-13,00) p ₂ =0,046
Больные диссеминированным туберкулезом легких (ДТЛ)	Отрицательная проба Манту	16,50 (7,00-21,00) p ₁ =0,002	5,50 (3,00-8,00) p ₁ =0,017	7,00 (4,00-11,00) p ₁ =0,021
	Положительная проба Манту	11,50 (9,00-16,50) p ₁ =0,003 p ₂ =0,016	5,20 (2,75-8,00) p ₁ =0,014	5,50 (3,50-9,00)
Больные фиброзно- кавернозным туберкулезом легких (ФКТЛ)	Отрицательная проба Манту	25,00 (12,00-26,00) p ₃ =0,0001	3,40 (2,00-4,00)	11,00 (5,00-14,00) p ₁ =0,014 p ₃ =0,0006
	Положительная проба Манту	15,50 (13,00-18,00) p ₁ =0,003 p ₂ =0,047	6,10 (2,20-10,00) p ₁ =0,045 p ₂ =0,008	6,50 (2,00-11,00) p ₂ =0,002

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p₂ – по сравнению с параметрами у больных с отрицательной пробой Манту; p₃ – по сравнению с параметрами у больных ДТЛ.

Известно, что главными клетками-мишенями воздействия Treg-лимфоцитов являются активированные CD4⁺- и CD8⁺-клетки – основные эффекторные клетки противотуберкулезного иммунитета [Pace L. et al., 2005]. Выявленное в настоящем исследовании пониженное содержание Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD4⁺CD25⁺, не экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3, у туберкулинположительных пациентов вне зависимости от клинической формы ТЛ (табл. 1) и в отсутствие взаимосвязи с лекарственной чувствительностью МБТ к ПТП по сравнению с группой здоровых доноров, по всей видимости, можно рассматривать как проявление Т-клеточного иммунодефицита.

Предположительно туберкулиновая анергия у больных ТЛ ассоциирована с наличием супрессорной активности регуляторных Т-клеток и развитием неспецифической супрессии,

проявляющейся в угнетении пролиферации Th1-лимфоцитов [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001], что подтверждается наличием отрицательных корреляционных взаимосвязей между количеством Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и пролиферативной активностью лимфоцитов крови – базальной ($r=-0,6$, $p<0,05$) и стимулированной PPD ($r=-0,7$, $p<0,05$) вне зависимости от клинической формы заболевания. Это является еще одним доказательством того, что именно CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клетки оказывают негативный эффект на пролиферацию лимфоцитов и являются ведущим фактором иммуносупрессии при туберкулезе легких.

Известно, что Treg обладают способностью ингибировать функции других клеток иммунной системы при непосредственном контакте или опосредованно через секрецию иммунорегуляторных цитокинов: IL-10 и трансформирующего фактора роста (TGF) β [Lee D.C. et al., 2010; Nishikawa H., Sakaguchi S., 2005; Sakaguchi S. 2004; Takahashi T. et al., 1998].

В ходе проведенных исследований нами было зарегистрировано повышение уровня базальной и VCG-индуцированной продукции IL-10 *in vitro* при ИТЛ вне зависимости от реакции на туберкулин. Аналогичные изменения наблюдались при лекарственно-чувствительном ИТЛ и лекарственно-устойчивом ФКТЛ (табл. 2). Снижение секреции IL-10 *in vitro* было отмечено только в группе пациентов с лекарственно-чувствительным ФКТЛ (табл. 2). Уровень базальной секреции IL-10 у больных ФКТЛ с отрицательной реакцией Манту был сопоставимым с аналогичным показателем у здоровых доноров, в то время как уровень VCG-индуцированной продукции значительно снижался, что свидетельствует об истощении IL-10-секреторного резерва CD4-позитивных лимфоцитов, в числе которых могут быть и Treg-лимфоциты.

Активированные Treg-клетки сами по себе анергичны: *in vitro* они слабо пролиферируют и слабо секретируют цитокины, и лишь IL-10 и TGF- β секретируются Treg-клетками в значительных количествах [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Kuniyasu Y. et al., 2000], что отчасти подтверждается положительной корреляцией между уровнем образования TGF- β и количеством в крови Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ при ФКТЛ ($r=0,9$, $p<0,01$).

При анализе спонтанной продукции TGF- β в группе больных ФКТЛ значимое ее увеличение относительно группы здоровых доноров было зарегистрировано как у туберкулинположительных (1515,26 пг/мл, $p<0,01$), так и у туберкулинотрицательных (2198,68 пг/мл, $p<0,05$) пациентов. Выраженное снижение базального уровня секреции медиатора *in vitro* было отмечено в группе больных ИТЛ и ДТЛ с положительной пробой Манту.

Уровень продукции IL-10 и TGF- β in vitro у больных с лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких (ТЛ) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-10 (пг/мл)		TGF- β (пг/мл)	
		Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG
Здоровые доноры		25,29 (13,50-33,56)	26,21 (22,74-52,2)	1108,75 929,80-1487,20	1087,80 500,00-1412,60
Больные с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких	Инфильтративный ТЛ	44,37 (19,27-59,29) p ₁ =0,001	57,47 (31,66-64,90) p ₁ =0,024 p ₅ =0,006	1078,95 (801,30-1650,05)	1030,80 (897,10-1180,00)
	Диссеминированный ТЛ	23,72 (9,45-52,14) p ₂ =0,00007	33,36 (20,73-65,73) p ₂ =0,00007	951,80 (750,20-1452,00)	685,20 (580,03-824,01) p ₁ =0,0001 p ₂ =0,002 p ₃ =0,003 p ₅ =0,035
	Фиброзно-кавернозный ТЛ	20,82 (11,53-45,49) p ₁ =0,00007 p ₂ =0,00007	12,20 (10,82-28,38) p ₁ =0,044 p ₂ =0,00007 p ₄ =0,008	1360,70 (871,97-2384,58) p ₃ =0,00007	731,28 (721,82-2877,60) p ₁ =0,013 p ₂ =0,021 p ₅ =0,049
Больные с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких	Инфильтративный ТЛ	27,44 (24,01-45,96) p ₄ =0,00007	34,32 (26,00-59,29)	584,30 (317,09-775,60) p ₁ =0,0001 p ₂ =0,000001 p ₄ =0,00007	349,50 (197,54-912,60) p ₁ =0,015 p ₂ =0,004 p ₄ =0,002
	Диссеминированный ТЛ	19,27 (17,83-19,27)	26,79 (23,71-33,36) p ₂ =0,044 p ₅ =0,005	1686,74 (907,28-2466,20) p ₁ =0,00007 p ₂ =0,00007 p ₄ =0,003	2016,08 (806,96-3225,20) p ₁ =0,034 p ₂ =0,041 p ₄ =0,021 p ₅ =0,005
	Фиброзно-кавернозный ТЛ	32,25 (10,82-53,68) p ₃ =0,0005	98,13 (42,46-153,80) p ₁ =0,0004 p ₂ =0,00007 p ₃ =0,005 p ₄ =0,031 p ₅ =0,028	2621,30 (2486,00-2756,60) p ₁ =0,00007 p ₂ =0,045 p ₃ =0,00009 p ₄ =0,005	2403,50 (1969,00-2838,00) p ₁ =0,0009 p ₂ =0,0001 p ₄ =0,033

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p₂ – по сравнению с параметрами у больных ИТЛ; p₃ – по сравнению с параметрами у больных ДТЛ; p₄ – по сравнению с параметрами у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p₅ – по сравнению с базальным уровнем секреции.

При оценке BCG-индуцированной продукции TGF- β обращал на себя внимание тот факт, что выраженное ее увеличение регистрировалось только в группе туберкулинположительных больных ФКТЛ (2838,00 пг/мл, p<0,05), у всех остальных пациентов (главным образом туберкулинотрицательных), напротив, указанный параметр

снижался.

Анализ продукции TGF- β у больных ТЛ с различной чувствительностью возбудителя к ПТП показал наличие разнонаправленных ее изменений у больных с лекарственно-устойчивыми формами заболевания (табл. 2). Так, у больных ДТЛ и ФКТЛ с лекарственной устойчивостью возбудителя отмечалось значительное увеличение секреции данного медиатора *in vitro* (базальной и BCG-индуцированной), тогда как при ИТЛ было зафиксировано ее снижение. Ниже нормы оказался также уровень продукции TGF- β при индукции клеток вакцинным штаммом BCG при лекарственно-чувствительном ДТЛ и ФКТЛ (табл. 2).

Анализируя вышеуказанные данные, можно предположить, что у обследованных нами больных ИТЛ ведущим цитокином, способствующим поляризации иммунного ответа в направлении Th2, равно как и формированию иммуносупрессии, является IL-10. Несмотря на то, что Treg-клетки являются основными клетками-продуцентами обоих медиаторов – IL-10 и TGF- β , закономерность увеличения продукции TGF- β прослеживается именно при тяжелых деструктивных формах ЛУТЛ (ДТЛ и ФКТЛ), в том числе сопровождающихся отрицательной реакцией Манту.

Как известно, многие цитокины, в том числе и исследованные нами IL-2, IL-4, IL-10 и TGF- β , имеют рецепторы на поверхности иммунокомпетентных клеток, через которые реализуются их регуляторные потенции. Одним из факторов, выступающих в качестве акцептора избытка циркулирующих иммунорегуляторных цитокинов, а также регулятора пролиферации и периферической экспансии иммунокомпетентных клеток, может рассматриваться α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ). Существенная часть цитокинов образует комплексы с α_2 -МГ и поступает в клетки через рецепторы данного белка [Lindner I. et al., 2010; Зорин Н.А. и соавт., 2004].

При проведении исследований нами было установлено увеличение концентрации α_2 -МГ в сыворотке крови у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (до 4,84-7,47 г/л при норме 3,46 г/л, $p < 0,05-0,01$), при этом более выраженное ее увеличение было выявлено у туберкулинположительных пациентов. Корреляционный анализ показал наличие положительной взаимосвязи между концентрацией α_2 -МГ в сыворотке крови и уровнем секреции *in vitro* IL-10 ($r=0,7$, $p < 0,001$ у больных с лекарственно-устойчивым ДТЛ) и TGF- β ($r=0,8$, $p < 0,001$ при лекарственно-чувствительном ФКТЛ).

Имеются сведения, что индукторами биосинтеза α_2 -МГ служат факторы роста, регулируемые самим белком. Иницирующим стимулом к продукции α_2 -МГ является образование комплексов α_2 -МГ с TGF- β [Зорин Н.А. и соавт., 2006, 200; Birkenmeier G.,

2001]. Принимая во внимание данные литературы и результаты собственных исследований, можно предположить, что высокий уровень продукции TGF- β индуцирует увеличение концентрации α_2 -МГ в крови. Данное предположение подтверждается наличием положительной зависимости между показателями базальной секреции TGF- β *in vitro* и концентрации α_2 -МГ в крови ($r=0,6$, $p<0,05$) у пациентов с ФКТЛ.

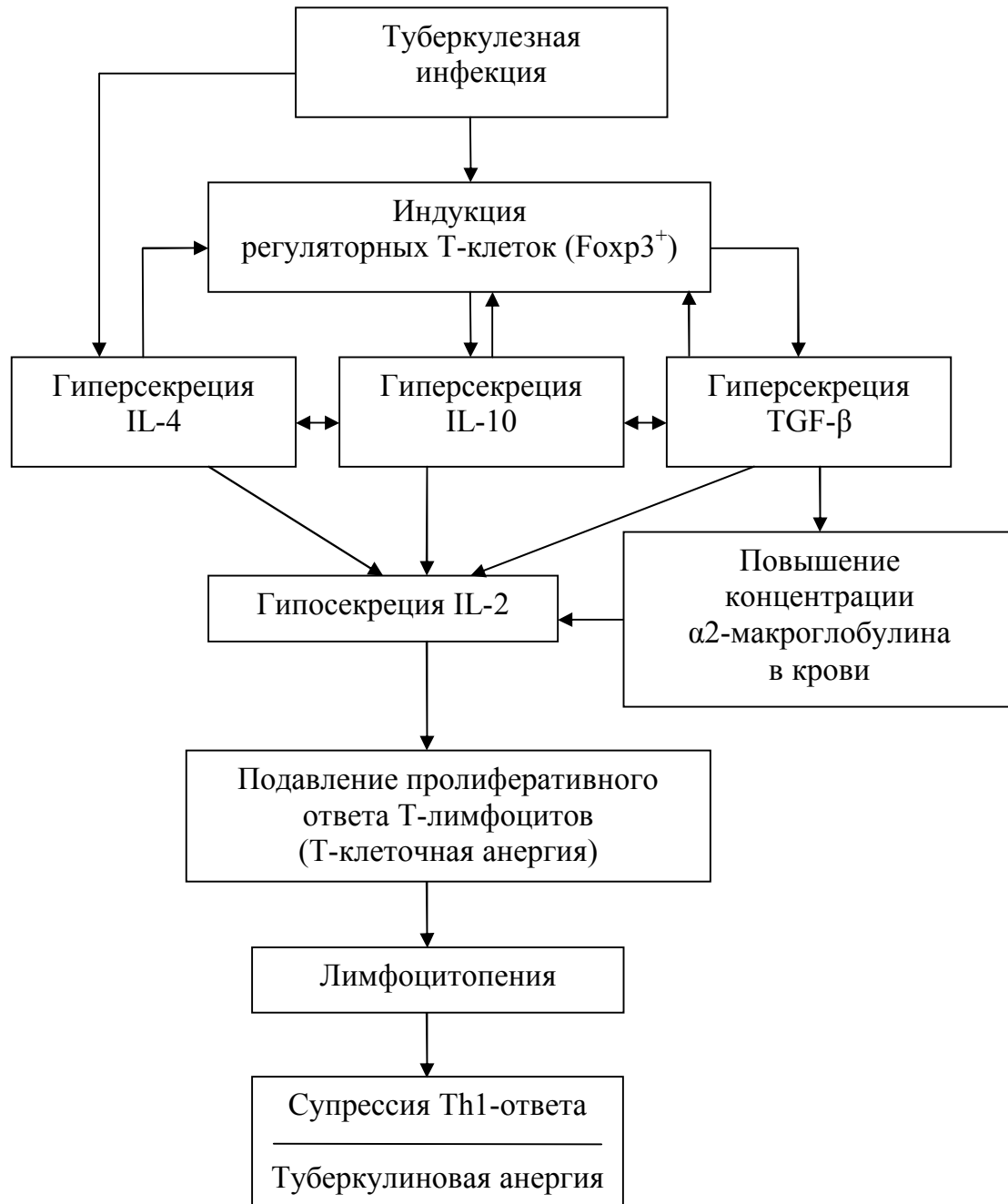


Рис. 1. Факторы супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких (по результатам собственных исследований)

Учитывая, что дефицит циркулирующего α_2 -МГ, связывающего ионы цинка, опосредует активацию цинкзависимого гормона – тимулина, способного запускать секрецию

IL-2 [Зорин Н.А. и соавт., 2004], можно думать, что механизм снижения секреции IL-2 *in vitro* у больных ТЛ связан с избытком α_2 -МГ в крови.

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что наиболее значимыми факторами формирования супрессии иммунного ответа при ТЛ (рис. 1) являются увеличение количества Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов и α_2 -МГ в крови, ассоциированное с гиперпродукцией IL-4, IL-10 и TGF- β на фоне снижения секреции IL-2. Можно предположить, что при ТЛ факторы супрессии иммунного ответа преобладают над факторами активации, что может впоследствии обуславливать дисрегуляцию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа, и способствовать формированию комбинированной иммунологической недостаточности и дальнейшему прогрессированию туберкулезного процесса.

ВЫВОДЫ

1. Отрицательная реакция Манту (туберкулиновая анергия) вследствие супрессии антигенспецифического иммунного ответа у больных диссеминированным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких сопряжена с лекарственной резистентностью *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам.
2. Ведущими факторами иммуносупрессии при туберкулезе легких являются повышение содержания Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) и α_2 -макроглобулина в крови, дефицит секреции IL-2 *in vitro*, ассоциированный с лимфоцитопенией, гипоэргической пролиферативной реакцией лимфоцитов крови и гиперпродукцией (при инфильтративном лекарственно-чувствительном, диссеминированном и фиброзно-кавернозном лекарственно-резистентном туберкулезе легких) цитокинов с противовоспалительной и супрессорной активностью.
3. Цитокинопосредованная супрессия Th1-ответа при инфильтративном туберкулезе легких определяется гиперсекрецией IL-10, при диссеминированном – IL-4 и TGF- β . При фиброзно-кавернозном туберкулезе легких сочетанное повышение базальной и BCG-индуцированной продукции IL-10 и TGF- β *in vitro* характеризует активацию CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов.
4. Увеличение относительного содержания CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁻ Foxp3-позитивных регуляторных Т-клеток в крови у больных туберкулезом легких вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам сочетается с дефицитом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Т-лимфоцитов.
5. Базальная и BCG-индуцированная гипосекреция IL-10 и TGF- β *in vitro* при лекарственно-резистентном инфильтративном и лекарственно-чувствительном диссеминированном и

фиброзно-кавернозном туберкулезе легких, коррелирующая с количеством CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-клеток в крови, свидетельствует о снижении функционального резерва CD25-негативных регуляторных Т-клеток с иммуносупрессорной активностью.

6. У больных с туберкулиновой анергией лимфоцитопения, дефицит BCG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro*, повышение содержания CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-клеток в крови и базальной продукции IL-4 и TGF-β (при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких) более значимы, чем у пациентов с положительной пробой Манту.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сравнительная оценка показателей адаптивного иммунитета при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких [текст] / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, В.В. Новицкий, В.А. Серебрякова, И.О. Наследникова, А.Е. Колосова [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. – № 3. – С. 288-289.
2. Зависимость продукции ИЛ-2 от варианта туберкулеза легких (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый) [текст] / О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Ю.В. Стамбула, А.Е. Колосова [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2. – № 2-3. – С. 245.
3. Иммунопатогенез бактериальных и вирусных инфекций: роль полиморфизма генов цитокинов [текст] / И.О. Наследникова, О.И. Уразова О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Т.Е. Будкина, О.А. Васильева, Е.Л. Никулина, Н.А. Сухоленцева, А.Е. Колосова [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. – № 3. – С. 289.
4. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких [текст] / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, А.Е. Колосова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 3. – С. 31-35.
5. The molecular-genetic bases of management of human adaptable blood system reactivity during infection / V.V. Novitsky, O.I. Urazova, O.V. Voronkova, I.O. Naslednikova, A.E. Kolosova [et al.] // Internationaler congress and fachmesse. – Hannover, 2008. – P. 65-66.
6. Реактивность лимфоцитов крови при туберкулезе легких [текст] / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, В.А. Серебрякова, А.Е. Колосова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 1. – С. 35-40.
7. Allelic polymorphism of cytokine genes during pulmonary tuberculosis / I.O. Naslednikova,

O.I. Urazova, O.V. Voronkova, A.K. Strelis, V.V. Novitsky, E.L. Nikulina, R.R. Hasanova, A.E. Kolosova [et al.] // Bulletin of Experimental biology and medicine. – 2009. – Vol. 148. – P. 175-179.

8. Молекулярно-генетические аспекты прогнозирования и иммунотерапии туберкулезной инфекции [текст] / В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.О. Наследникова, А.К. Стрелис, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина, О.В. Колоколова, Т.Е. Кононова, Н.П. Пирогова, Е.Л. Никулина, Н.А. Сухаленцева, А.Е. Колосова // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40. – № 2. – С. 40-46.
9. TGF- β как фактор иммуносупрессии у туберкулиноцитрательных пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких [текст] / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова и [др.] // Инновации в медицине. Социально значимые инфекции: материалы VIII Международной российско-германской научно-практической конференции. – Новосибирск, 2009. – С. 198-199.
10. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у больных инфильтративным туберкулезом легких в зависимости от выраженности туберкулиновой реакции [текст] / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, Н.В. Теплова и [др.] // Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2009: материалы научной конференции молодых ученых с международным участием, посвященной 90-летию кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии СПбГМУ им. академика И.П.Павлова. – СПб., 2009. – С. 47.
11. Уровень секреции TGF- β in vitro и A₂-макроглобулина в сыворотке крови у больных деструктивными формами туберкулеза легких [текст] / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова и [др.] // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов: труды II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Новосибирск, 2010. – С. 169-173.
12. Особенности цитокинового профиля у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких [текст] / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, В.А. Серебрякова и [др.] // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVI Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2010. – С. 79-81.
13. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких [текст] / А.Е. Колосова, О.И. Уразова, Е.Г. Чурина, [и др.] // Науки о человеке: материалы XI Конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск: СибГМУ, 2010. – С. 57-58.
14. Особенности продукции провоспалительных цитокинов у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких [текст] / Е.Г. Чурина, А.Е. Колосова, В.А. Серебрякова [и др.] // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVI

Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2010. – С. 184-185.

15. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции [текст] / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, А.Е. Колосова, Е.Л. Никулина // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 3. – С. 3-7.
16. Особенности продукции цитокинов и α_2 -макроглобулина у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких [текст] / А.Е. Колосова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, О.В. Воронкова, В.А. Серебрякова // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 1. – С. 48-52.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких

ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких

ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез лёгких

ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез лёгких

МБТ – микобактерия туберкулеза

ППП – противотуберкулёзные препараты

ТЛ – туберкулез лёгких

ФКТЛ – фиброзно-кавернозный туберкулез легких

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

IL – Interleukin – интерлейкин

TGF – Transforming growth factor – трансформирующий фактор роста

Th – T-helper – субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов/хелперов

Treg – регуляторные Т-клетки (Foxp3⁺)