

На правах рукописи



ЧУРИНА ЕЛЕНА ГЕОРГИЕВНА

**РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК
В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ
С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ**

**14.03.03 – патологическая физиология
14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Томск – 2012

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

Научные консультанты:

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

Иванова Светлана Александровна

доктор медицинских наук,
профессор

Долгих Татьяна Ивановна

Ведущая организация:

НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздравсоцразвития России, г. Москва, ул. Достоевского, д. 4

Защита состоится: «___» _____ 2012 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В современных условиях туберкулез легких (ТБ) характеризуется тяжелым клиническим течением, патоморфозом, формированием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) к основным противотуберкулезным препаратам (ППП), выраженной функциональной недостаточностью иммунной системы пациента и высоким процентом летальных исходов [Комиссарова О.Г., 2011; Филинюк О.В., 2011; Jeon D.S. et al., 2011; Wells C.D., 2010; Мишин В.Ю. и соавт., 2009]. Следует отметить, что на сегодня МЛУ МБТ у впервые выявленных больных является глобальной общемировой проблемой. По данным ВОЗ (2010), основанным на информации, поступившей из 114 стран мира, первичная МЛУ МБТ составляет около 4 % от всех впервые выявленных случаев ТБ, а на территории стран СНГ данный показатель выше в 3 – 6 раз [Филинюк О.В., 2011; Caminero J.A., 2010; WHO, 2010; Wright A. et al., 2009].

В основе патогенеза распространенного деструктивного ТБ лежит дисрегуляция антигенспецифического Th1-зависимого иммунного ответа [Orme I.M., 2011; Jacobsen M. et al., 2011; Темчура О.В. и соавт., 2007; Гунтупова Л.Д. и соавт., 2006; Raja A., 2004]. Однако по-прежнему остается открытым вопрос о том, включение каких механизмов иммунного ответа на МБТ и на каком его этапе способствует возникновению «иммунной девиации» и патологическому прогрессирующему течению туберкулезной инфекции.

В течение последнего десятилетия при исследовании особенностей иммунопатогенеза инфекционных заболеваний, в том числе ТБ, особое внимание уделяется регуляторным Т-клеткам, которые обладают супрессорной активностью и таким образом способствуют снижению интенсивности протективного антигенспецифического иммунного ответа, направленного на эрадикацию патогенов различной природы [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Ярилин А.А., 2010; Koval'chuk L.V. et al., 2010; Курганова Е.В. и соавт., 2008; Chen X. et al., 2007; Guyot-Revol V. et al., 2006; Железникова Г.Ф., 2006]. 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 у больных ТБ [Wergeland I. et al., 2011; Но Р. et al., 2010; Geffner L. et al., 2009; Сахно Л.В. и соавт., 2006, 2004]. На сегодняшний день сведения о роли регуляторных Т-клеток в патогенезе различных заболеваний немногочисленны. «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-, T_H17-, Th-активированных клеток по спектру секретируемых цитокинов и способны супрессировать функции всех перечисленных клонов Т-хелперов, а также обеспечивать периферическую иммунологическую толерантность к аутоантигенам [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Sakaguchi S., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Козлов В.А., 2010; Ярилин А.А., 2010; Lee D.C. et al., 2010].

Конверсия, индукция Treg и реализация ими супрессорных свойств опосредуются преимущественно иммунорегуляторными цитокинами – интерлейкином (IL) 2, IL-4, IL-10, интерфероном (IFN) γ , трансформирующим фактором роста (TGF) β . Допускается также возможность прямого контактного взаимодействия Treg с клеткой-мишенью, влияние Treg на апоптоз и пролиферацию лимфоцитов [Klein S. et al., 2011; Hünig T. et al., 2010; Wu Y.E. et al., 2010; Sharma P.K. et al., 2010].

В иммунопатогенезе ТБ тесно взаимосвязаны механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, посредниками которых считаются, в том числе, $\gamma\delta$ T-клетки [Witherden D.A., Navran W.L., 2011; Xi X. et al., 2011; Spada E. et al., 2010; Beutler B., Hoffmann J., 2008; Moser B., Brandes M., 2006; Zhao H. et al., 2005; Steinman R.M., 2004]. Они играют решающую роль не только в реализации ответа «первой линии защиты» на патоген, но и выполняют регуляторные (иммуносупрессорные) функции [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Viganó P. et al., 2004; Roark C.L. et al., 2004].

В структуре цитокинов, секретируемых регуляторными Т-клетками, наиболее широким спектром супрессорного воздействия обладают TGF β , IL-10, IL-4 и IFN γ [Симбирцев А.С., 2011; Miyara M., Sakaguchi S., 2007]. В настоящее время высказывается предположение о связи генетически детерминированной гипер- или гипопродукции цитокинов с качеством иммунного ответа, тяжестью и продолжительностью инфекционных заболеваний [Абрамов Д.Д. и соавт., 2011; Коненков В.И. и соавт., 2011, 2010; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010; Шевченко А.В. и соавт., 2010; Saliu O.Y. et al., 2006; Hodak E. et al., 2005].

В свете указанных выше данных, актуальным аспектом проблемы иммунопатогенеза ТБ представляется поиск ключевых механизмов, обуславливающих супрессию противотуберкулезного иммунитета, оценка роли различных субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов и $\gamma\delta$ T-клеток в ее формировании и, как следствие, дисрегуляции вторичного иммунного ответа. Понимание этого позволит не только определить новые фундаментальные механизмы патогенеза ТБ, но и разработать комплексные подходы к персонализированной коррекции иммунодефицитных состояний, сопровождающих течение ТБ, а также сформировать теоретическую основу для создания современных методов прогноза и вакцинопрофилактики туберкулезной инфекции.

Цель исследования: установить механизмы иммуносупрессии и роль регуляторных Т-клеток в их реализации при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*.

Задачи исследования:

1. Оценить особенности субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток и эффективность вторичного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* у больных с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, лекарственной чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам и характера реакции Манту.

2. Выявить механизмы формирования иммуносупрессии при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*.

3. Охарактеризовать иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-клеток при туберкулезе легких с лекарственной чувствительностью и множественной лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Выявить иммуногенетические маркеры цитокинопосредованной супрессии иммунного ответа у больных туберкулезом легких на основе анализа функционального полиморфизма генов *IL2* (T-330G), *IL4* (C-590T), *IL10* (C-592A), *IFNG* (+874A/T), *TGFB* (C-509T).

5. Определить иммунологические параметры, позволяющие прогнозировать множественную лекарственную устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* у больных с впервые выявленным туберкулезом легких.

Научная новизна исследования. Впервые проведено комплексное исследование этиопатогенетических факторов супрессии антигенспецифического иммунного ответа при различных клинических формах впервые выявленного распространенного деструктивного ТБ в зависимости от реакции на внутрикожное введение туберкулина (проба Манту) и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) до начала специфической химиотерапии. Показано, что увеличение количества $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$, а также *Foxp3*-позитивных $CD4^+CD25^+$ (Treg) и $CD4^+CD25^-$ регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью у больных ТБ с положительной и отрицательной реакцией Манту ассоциировано со снижением числа *Foxp3*-негативных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток в крови и гиперсекрецией *in vitro* цитокинов с противовоспалительной и иммуносупрессорной активностью (IL-4, IL-10, TGFβ). При этом указанные изменения более выражены при МЛУ фиброзно-кавернозном ТБ, а туберкулиновая анергия у больных диссеминированным и фиброзно-кавернозным ТБ сопряжена с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* к основным ПТП.

Наряду с этим у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания, характера реакции Манту и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным ПТП установлено увеличение численности $CD3^+CD4^-CD25^+$ регуляторных Т-клеток при снижении количества γδТ-лимфоцитов в крови. Обнаружены разнонаправленные изменения содержания $CD45RO^+$ Т-клеток памяти в крови у больных ТБ с наиболее выраженным снижением их количества (в 4,5 раза) при диссеминированном МЛУ ТБ с отрицательной реакцией Манту и максимальным увеличением (в 2,5 раза) при инфильтративном и фиброзно-кавернозном МЛУ ТБ.

Показано, что выявленные у больных МЛУ ТБ снижение активности спонтанной и PPD-индуцированной пролиферации и активация апоптоза лимфоцитов коррелируют с увеличением количества $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$, $CD3^+CD4^-CD25^+$ регуляторных Т-клеток и снижением количества γδТ-клеток в крови.

С привлечением современных молекулярно-генетических и иммунологических методов исследования проанализировано модулирующее влияние аллельного полиморфизма генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *TGFB*, *IFNG* на секрецию *in vitro* соответствующих иммунорегуляторных цитокинов при отдельных клинических формах ТБ. Показано, что частота встречаемости аллеля G и генотипа GG (T-330G) гена *IL2*, аллеля T и генотипа TT (C-590T) гена *IL4*, аллеля T и генотипа TT (C-509T) гена *TGFB* значимо выше при диссеминированном, чем при инфильтративном ТБ. Риск развития ТБ ассоциирован с генотипами GG (T-330G) гена *IL2*, CT и TT (C-590T)

гена *IL4*, *AA* (C-592A) гена *IL10*, *TT* (C-509T) гена *TGFB* и *AA* (+874A/T) гена *IFNG*. Выделены ключевые иммуногенетические факторы, опосредующие изменения секреции основных цитокинов-регуляторов иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*. В частности установлено, что гипосекреция IL-2 и гиперпродукция IL-10, TGFβ и IL-4 *in vitro* обусловлены носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (T-330G) гена *IL2*, 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*.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что иммуносупрессия при ТБ с МЛУ МБТ опосредована повышением содержания CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}, CD3⁺CD4⁻CD25⁺ субпопуляций регуляторных Т-клеток в крови, снижением количества циркулирующих γδТ-клеток, генетически детерминированной гиперпродукцией IL-4, IL-10 и TGF-β на фоне дефицита секреции IL-2 *in vitro* в ассоциации с лимфоцитопенией и подавлением пролиферативной реакции лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигеном. При этом супрессорные эффекты регуляторных Т-клеток не исчерпываются секрецией медиаторов, ингибирующих антигенспецифический иммунный ответ, и реализуются за счет активации апоптоза и угнетения пролиферации эффекторных клонов Т-хелперов при диссеминированном и фиброзно-кавернозном ТБ. Впервые построена модель прогноза МЛУ ТБ по совокупности количественных показателей иммунного статуса пациента и показано, что наиболее информативными для прогноза МЛУ ТБ являются количество CD45R0⁺ Т-клеток памяти, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов в периферической крови.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные значительно расширяют представления об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, вносят существенный вклад в понимание механизмов формирования супрессии иммунного ответа, развития и прогрессирующего течения инфекционного процесса у больных с распространенным деструктивным ТБ с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis*.

Результаты исследования субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток крови и секреции *in vitro* провоспалительных и противовоспалительных (с супрессорной активностью) цитокинов в ассоциации с аллельным полиморфизмом иммунорегуляторных генов (*IL2*, *IL4*, *IL10*, *TGFB* и *IFNG*) представляются важными для формирования знаний о взаимосвязи генетического полиморфизма человека с развитием ТБ, позволяют глубже проникнуть в этиопатогенез данной патологии.

Полученные результаты теоретически обосновывают необходимость включения мероприятий по иммунокоррекции, направленной на регуляцию иммунного ответа в целях инактивации механизмов иммуносупрессии и устранения патологической «иммунной девиации», в стандартную программу лечения больных туберкулезом легких. В связи с этим целесообразным и перспективным представляется применение иммуномодуляторов, нормализующих баланс регуляторных и эффекторных клеток-участников иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*, иммуноактивных препаратов, стимулирующих факторы протективного врожденного иммунитета, а также методов цитокиновой, антицитокиновой и клеточной иммунотерапии в качестве патогенетически обоснованного лечения больных туберкулезом легких.

Разработанная математическая модель прогноза, основанная на оценке количественных показателей иммунного статуса пациента, позволяет прогнозировать МЛУ МБТ у больных туберкулезом легких при выявлении заболевания и применять меры коррекции лечебного воздействия. Положения диссертации могут служить базисом не только для дальнейшего детального изучения иммунопатогенеза туберкулезной инфекции, но и для разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения и исходов ТБ, что наиболее значимо у пациентов с туберкулиновой анергией и МЛУ возбудителя (особенно в случае диссеминированной и фиброзно-кавернозной форм заболевания).

Положения, выносимые на защиту:

1. При туберкулезе легких дисбаланс субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов крови проявляется увеличением количества *Foxp3*-позитивных $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ Т-клеток с иммуносупрессорной активностью и $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$, $CD3^+CD4^-CD25^+$ Т-лимфоцитов в условиях дефицита $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ и $\gamma\delta TCR$ -экспрессирующих Т-клеток. У больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) *Mycobacterium tuberculosis* и отрицательной реакцией Манту (туберкулиновой анергией) указанные изменения более выражены, чем у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких и положительной реакцией Манту.

2. Вариабельность эффективности вторичного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* связана с увеличением количества $CD45RO^+$ Т-клеток памяти при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких и туберкулезе легких с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* и снижением содержания $CD45RO^+$ Т-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких с туберкулиновой анергией.

3. Ведущими патогенетическими факторами иммуносупрессии при туберкулезе легких с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* являются: дефицит секреции $IL-2$ *in vitro* и увеличение количества в крови регуляторных Т-клеток, содержащих внутриклеточный транскрипционный фактор *Foxp3*, Т-лимфоцитов с высокой экспрессией молекулы $CD25$ и $CD4$ -негативных регуляторных Т-клеток, ассоциированное с активацией апоптоза и подавлением пролиферативной реакции лимфоцитов; генетически детерминированная и опосредованная увеличением количества регуляторных Т-клеток в крови гиперпродукция *in vitro* $IL-4$, $IL-10$, $TGF\beta$. Данные изменения, учитывая дефицит циркулирующих $\gamma\delta T$ -клеток «первой линии защиты» на фоне дисрегуляции вторичного иммунного ответа, свидетельствуют о наличии у больных туберкулезом легких с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* многокомпонентной функциональной недостаточности иммунной системы.

4. Дисбаланс продукции иммунорегуляторных цитокинов *in vitro* у больных туберкулезом легких ассоциирован с аллельным полиморфизмом их генов: гипосекреция $IL-2$ определяется носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, а увеличение продукции цитокинов с супрессорной активностью $IL-4$, $IL-10$ и $TGF\beta$ – носительством аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-590T*) гена *IL4*, аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10*, аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-509T*) гена *TGFB*.

5. Согласно модели прогноза варианта туберкулеза легких (лекарственно-чувствительный или МЛУ), построенной на основе пошагового дискриминантного анализа, высоко информативным при предсказании МЛУ *Mycobacterium*

tuberculosis у впервые выявленных больных туберкулезом легких является комплексное определение показателей, характеризующих содержание CD45R0⁺ Т-клеток памяти, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов в крови.

Реализация и апробация материала работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Euromedica Hannover 2008. Internationaler congress & fachmesse. Modern aspekte der prophylaxe, behadlung und rehabilitation (Hannover, 2008), Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии – 2009» (Санкт-Петербург, 2009), Российской научно-практической конференции, посвященной 85-летию кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии Сибирского государственного медицинского университета «Актуальные проблемы инфекционной патологии» (Томск, 2009), VIII Международной российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекционные заболевания» (Новосибирск, 2009), XV и XVI межгородских конференциях молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2009, 2010), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов» (Новосибирск, 2010), XI Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2010), Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» (Новосибирск, 2010), IX Российско-германской конференции форума Коха – Мечникова «Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении» (Новосибирск, 2010), Всероссийской научной конференции «Фундаментальные вопросы гематологии. Достижения и перспективы» (Екатеринбург, 2010), 41st Union World Conference on Lung Health (Берлин, 2010), на Президиуме СО РАМН (Новосибирск, 2011), на научно-образовательных семинарах «Патофизиология системы крови и иммунитета» при Центре компетенции по проблеме инфекционных болезней им. И.И. Мечникова и Р. Коха ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2008 – 2011), на научных семинарах кафедр патофизиологии, иммунологии и аллергологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2008 – 2011).

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2013 годы» (ГК №02.512.11.2112 «Молекулярно-генетические основы управления адаптационной реактивностью системы крови человека при инфекции», руководитель – академик РАМН, профессор В.В. Новицкий; ГК №16.512.11.2046 «Разработка комплекса молекулярно-генетических маркеров дизрегуляции иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* для оптимизации диагностики и коррекции вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких», руководитель – профессор О.И. Уразова), РФФИ (11-04-98057-р «Разработка комплекса иммунодиагностических биомаркеров для оптимизации лечения больных туберкулезом легких», руководитель – профессор О.И. Уразова).

Внедрение. Результаты, основные положения и выводы диссертации внедрены в учебный процесс в ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России на кафедрах патофизиологии (в тематических разделах «Патофизиология клетки», «Патофизиология иммунитета», «Воспаление»), иммунологии и аллергологии (в тематических разделах «Функциональная организация иммунной системы», «Регуляция иммунных процессов», «Иммунный статус человека», «Вторичные иммунодефициты», «Аллергические заболевания»), фтизиатрии и пульмонологии (в тематических разделах «Иммунитет и аллергия при туберкулезе», «Патофизиология туберкулезного воспаления»).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 34 научных работы, из них 22 – в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 299 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов и указателя литературы. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 48 таблицами. Список литературы содержит 529 наименований, из них 247 отечественных и 282 иностранных источников.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке идеи, дизайна и планировании исследования. Результаты достигнуты, проанализированы и обобщены в выводах и положениях лично автором.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика клинического материала

В основу настоящей работы положены результаты комплексного клинко-лабораторного обследования 338 больных с распространенными деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза легких (ТБ) (248 мужчин и 90 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст – 47 ± 11 лет). Пациенты находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова) во фтизиатрических отделениях №1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева), №2 (зав. отд. – Т.З. Малиновская).

Диагноз ТБ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. У всех обследованных пациентов отмечался распространенный (более 4 сегментов) деструктивный характер поражения легочной ткани с вовлечением в патологический процесс преимущественно обоих легких. Инфильтративный туберкулез легких (ИТБ) был диагностирован у 209 (61,8 %) пациентов, диссеминированный туберкулез легких (ДТБ) – у 89 (26,6 %), фиброзно-кавернозный туберкулез легких (ФКТБ) – у 40 (12 %) (табл. 1).

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) и определения чувствительности к противотуберкулезным химиопрепаратам (методом абсолютных концентраций) произво-

дили посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна – Йенсена и Финн-2. Исследования проводились в бактериологических лабораториях Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова) и Томского областного противотуберкулезного диспансера (гл. врач – С.П. Мишустин).

У 178 обследованных больных ТБ (99 пациентов с ИТБ, 49 больных ДТБ и 30 больных ФКТБ) была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП). По данному критерию было выявлено 98 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 80 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу) (табл. 1).

У 140 обследованных больных ТБ проводилось внутрикожное введение туберкулина (реакция Манту) в объеме 0,1 мл раствора, содержащего 2 туберкулиновых единицы (ТЕ). В связи с тем, что при статистической обработке результатов не было выявлено значимых различий между группами больных с гиперергической и нормергической реакцией на туберкулин, их было решено объединить в одну группу с «положительной реакцией на туберкулин». Соответственно по аналогичной причине была сформирована группа пациентов с сомнительной и отрицательной реакцией Манту («отрицательная реакция на туберкулин»). Таким образом, было выделено 94 пациента с «положительной» (нормергической и гиперергической) реакцией на туберкулин и 46 пациентов с «отрицательной» (сомнительной и отрицательной) реакцией на туберкулин (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных туберкулезом легких (ТБ) по группам исследования

Принципы деления больных ТБ на группы исследования		ИТБ	ДТБ	ФКТБ	Всего
Всего пациентов		209	89	40	338
По чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам	С лекарственно-чувствительным ТБ	57	27	14	98
	С множественно лекарственно-устойчивым ТБ	42	22	16	80
По реакции на внутрикожное введение туберкулина	С положительной (нормо- и гиперергической) реакцией	61	25	8	94
	С отрицательной (сомнительной и отрицательной) реакцией	14	16	16	46

Примечание. Здесь и далее в таблицах: ТБ – туберкулез легких, ИТБ – инфильтративный ТБ, ДТБ – диссеминированный ТБ, ФКТБ – фиброзно-кавернозный ТБ.

Группу сравнения составили 118 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, не имеющих в анамнезе хронических соматических (в том числе аутоиммунных) заболеваний и аллергических реакций, заболеваемость которых острыми респираторными инфекциями составляла не чаще 2 – 3 раз в год.

Все пациенты с легочным туберкулезом были обследованы при поступлении на стационарное лечение до назначения терапии.

Критерием включения в исследование было наличие у впервые выявленных больных инфильтративного, диссеминированного и фиброзно-кавернозного ТБ. В исследование не включались: 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.

В связи с запланированным дизайном исследования и установлением иммунопатогенетических взаимосвязей между многочисленными параметрами из общего числа обследованных пациентов с ТБ были сформированы три группы. В первой группе пациентов изучались различные субпопуляции регуляторных Т-клеток, их функциональная активность, а также отдельные параметры врожденного и адаптивного иммунного ответа, опосредованные прямым или косвенным влиянием регуляторных Т-клеток для установления их роли в иммунопатогенезе ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Данную группу составили 140 пациентов, которые подразделялись на подгруппы по клинической форме ТБ (75 пациентов с ИТБ, 41 – с ДТБ и 24 – с ФКТБ), по лекарственной чувствительности возбудителя к основным ПТП (78 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 62 пациента, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда) и по реакции на внутрикожное введение туберкулина (94 пациента с положительной реакцией на туберкулин и 46 – с отрицательной реакцией на туберкулин).

Во второй группе пациентов оценивались пролиферация и апоптоз лимфоцитов крови. Данную группу составили 38 пациентов с ТБ, в основу деления которых на подгруппы были положены два принципа: клиническая форма ТБ (24 пациента с ИТБ, 8 – с ДТБ и 6 – с ФКТБ) и лекарственная чувствительность возбудителя к ПТП (20 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 18 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда).

В третьей группе пациентов нами проводилась оценка аллельного полиморфизма иммунорегуляторных генов цитокинов для выявления молекулярно-генетических механизмов дисбаланса иммунного ответа на *M. tuberculosis*. В данном случае для решения поставленной задачи была сформирована общая группа больных ТБ (160 человек), в которую включались больные со всеми исследованными клиническими формами ТБ (инфильтративной, диссеминированной, фиброзно-кавернозной). Оценка ассоциаций носительства отдельных полиморфизмов иммунорегуляторных генов с конкретной клинической формой ТБ и изменениями цитокинопродукции *in vitro* при отдельных клинических формах ТБ проводилась на примере подгруппы больных с ИТБ (110 человек) и ДТБ (40 человек). Пациенты с ФКТБ (10 человек) в виду их малочисленности не были включены в иммуногенетическое исследование.

Материал исследования

Материалом исследования являлась периферическая венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных ТБ до назначения специфической химиотерапии, а также супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови. Кровь забирали утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл. Исследования проводились в Центральной научно-исследовательской лаборатории (зав. – д-р мед. наук, профессор А.Н. Байков) и в лаборатории экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

Методы исследования

- Проведение пробы Манту (приказ Минздрава РФ № 229 от 27 июня 2001 года).
- Исследование секреции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro*:
 - Культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови по методу Е.Д. Гольдберга и соавт. [1992].
 - Определение содержания IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ и TGF β в супернатантах культуральных суспензий методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).
- Определение иммунологических фенотипов регуляторных Т-клеток крови методом проточной цитометрии:
 - Определение поверхностных молекул CD4, CD25 и внутриклеточного маркера иммуносупрессорной активности *Foxp3* в лимфоцитах периферической крови методом проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками («Becton Dickinson (BD)», США).
 - Определение поверхностных молекул CD3, CD4 и CD25 на лимфоцитах периферической крови методом проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными метками («Becton Dickinson (BD)», США).
 - Определение количества $\gamma\delta$ TCR-презентирующих лимфоцитов в периферической крови методом лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ Anti-TCR- γ/δ -1, меченных флуоресцентными метками («Becton Dickinson (BD)», США).
- Определение лимфоцитов крови, экспрессирующих маркер CD45R0, методом лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ Anti-CD45R0, меченных флуоресцентными метками («Becton Dickinson (BD)», США).
- Оценка спонтанной и индуцированной пролиферации лимфоцитов крови по методу, предложенному J. Carmichael [1987], основанному на трансформации лимфоцитов в культуральной среде под влиянием митогенов или антигенов в лимфобласты, оцениваемой по изменению цвета, связывающегося с клетками красителя 3-[4,5-диметилтиазол-2ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ, тиазол-синий) из синего в желтый.

- Оценка пролиферации и апоптоза лимфоцитов крови методом проточной цитометрии по определению популяции клеток, несущих фрагментированную ДНК, и популяции клеток, несущих тотальную ДНК, основанном на реакции, катализируемой экзогенной дезоксиуклеотидилтрансферазой (TdT), функция которой заключается в случайном добавлении бромированного дезоксиуридинтрифосфата (Br-dUTP) к свободным 3'-ОН-концам фрагментов двухцепочечной и одноцепочечной ДНК.

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

- Исследование полиморфных участков генов цитокинов с использованием аллельспецифичной амплификации специфических участков генома [Кофиади И.А., 2006].

- Статистический анализ результатов исследования.

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. Все количественные показатели проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро – Уилкса. 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 $p \leq 0,05$. Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков в анализируемых группах проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса.

С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Полученную корреляцию считали статистически значимой при $p \leq 0,05$. Для анализа связи между качественными признаками использовался коэффициент ассоциации r_a . При значениях коэффициента корреляции (коэффициента ассоциации) меньше 0,5 связь считалась сомнительной, от 0,5 до 0,75 – достаточной, более 0,75 – высокой [Боровиков В.П., 2003; Гланц С., 1999; Лакин Г.Ф., 1990].

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга с помощью точного теста Фишера.

Для построения модели прогноза МЛУ и лекарственной чувствительности (ЛЧ) у пациентов с ТБ был использован дискриминантный анализ [Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., 2002]. Для решения задачи прогноза по измеренным у пациента иммуно-

логическим показателям производился расчет дискриминантных функций, соответствующих МЛУ ТБ и ЛЧ ТБ. Пациента относили к той группе, для которой линейная дискриминантная функция принимала максимальное значение. При проведении расчетов использовался пакет прикладных программ Statistica 6.0 [Реброва О.Ю., 2002].

Наряду с пошаговым дискриминантным анализом была построена прогностическая модель с использованием метода многомерной логистической регрессии, в которую были включены все исследованные иммунологические показатели.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Роль регуляторных Т-клеток в иммунопатогенезе множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза легких

Главные функции регуляторных Т-клеток заключаются в способности обеспечивать периферическую иммунологическую толерантность к аутоантигенам и супрессировать пролиферацию различных клонов Т-хелперов (Th) – Th1, Th2, Th17, Th-активированных, Th-фолликулярных (T_{FH}) [Sakaguchi S., 2011; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Meagher C. et al., 2008; Донецкова А.Д. и соавт., 2007]. С другой стороны, избыточная активность регуляторных Т-клеток связана с ослаблением противоинфекционной защиты организма вследствие снижения интенсивности протективного иммунного ответа, направленного на эрадикацию патогенов различной природы [Lee D.C. et al., 2010; Darrasse-Jèze G. et al., 2009; Swee L.K. et al., 2009; Chen X. et al., 2007; Донецкова А.Д. и соавт., 2007; Guyot-Revol V. et al., 2006].

Выделяют как минимум две разновидности регуляторных Т-клеток: естественные тимические ($\gamma\delta$ T, NKT, Treg) и индуцированные на периферии (Treg, Tr1, Th3, CD8⁺CD28⁻) [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Lee D.C. et al., 2010; Liston A. et al., 2008]. Предполагается, что естественные Treg-клетки имеют фенотип CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, в то время как к индуцированным CD4⁺ регуляторным Т-клеткам относятся 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 Treg-клетки, т.е. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-лимфоциты [Ohkura N., Sakaguchi S., 2011; Ohkura N. et al., 2011; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Ярилин А.А., Донецкова А.Д., 2006; Pop S.M. et al., 2005].

При анализе субпопуляционного состава Т-хелперов и регуляторных Т-клеток в крови больных ТБ в зависимости от клинической формы заболевания, характера реакции Манту и чувствительности *M. tuberculosis* к ПТП выявлено, что у пациентов с ИТБ регистрируется повышение количества лимфоцитов с иммунофенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁻ (Т-хелперы) относительно такового у здоровых доноров, в то время как при диссеминированной и фиброзно-кавернозной формах заболевания количество CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-клеток снижается. При этом у больных ИТБ с отрицательной реакцией Манту количество Т-хелперов было ниже, чем у туберкулин-позитивных индивидов. В группах туберкулиннегативных больных ДТБ и ФКТБ наблю-

далась аналогичная картина. При ТБ с МЛУ МБТ у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ количество Т-хелперов было выше, чем у лекарственно-чувствительных пациентов, в то время как при ФКТБ наличие или отсутствие лекарственной устойчивости микобактерий не влияло на численность Т-хелперов. Стоит отметить, что данная субпопуляция Т-лимфоцитов является гетерогенной. В структуре CD4⁺ Т-лимфоцитов выявляются Th17, адаптивные регуляторные Т-клетки Th3, Tr1, Foxp3⁺, Th-активированные, фолликулярные Т-хелперы (T_{FH}) [Хайтов Р.М. и соавт., 2011; Кологривова И.В. и соавт., 2011; Кетлинский С.А., 2009; Хайдуков С.В. и соавт., 2009; Korn T. et al., 2009]

При анализе содержания регуляторных Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} в крови пациентов с ТБ в разгар клинической картины болезни и до назначения ПТП нами установлено значительное его повышение при всех клинических формах заболевания (табл. 2). Показательно, что численность CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} клеток была выше у пациентов с наиболее тяжелыми формами туберкулеза легких (ДТБ и ФКТБ), равно как и у больных с отрицательной реакцией Манту и при МЛУ ТБ независимо от клинической формы заболевания.

Таблица 2

Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (%), Me (Q₁-Q₃)

Группы обследованных лиц	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	γδТ
Здоровые доноры	2,63 (2,00–3,29)	5,12 (4,76–9,75)	25,45 (22,30–27,60)	0,19 (0,13–0,26)	0,56 (0,33–0,72)	4,88 (4,12–6,26)
Больные ИТБ	4,48 (3,10–6,00) <i>p</i> ₁ =0,047	6,95 (5,50–11,20)	17,52 (9,40–22,60) <i>p</i> ₁ =0,036	0,37 (0,28–0,45) <i>p</i> ₁ =0,042	0,72 (0,62–1,06) <i>p</i> ₁ =0,039	3,35 (2,86–4,15) <i>p</i> ₁ =0,029
Больные ДТБ	5,35 (3,75–7,14) <i>p</i> ₁ =0,014	6,30 (5,50–8,00)	13,50 (8,40–17,20) <i>p</i> ₁ =0,005 <i>p</i> ₂ =0,026	0,45 (0,25–0,67) <i>p</i> ₁ =0,021	1,18 (0,94–1,40) <i>p</i> ₁ =0,012 <i>p</i> ₂ =0,024	2,34 (2,11–3,06) <i>p</i> ₁ =0,014 <i>p</i> ₂ =0,046
Больные ФКТБ	4,80 (3,20–6,00) <i>p</i> ₁ =0,045	8,50 (4,20–11,50) <i>p</i> ₁ =0,049	19,50 (13,40–24,30) <i>p</i> ₁ =0,038 <i>p</i> ₂ =0,047 <i>p</i> ₃ =0,049	0,26 (0,22–0,38) <i>p</i> ₁ =0,042 <i>p</i> ₃ =0,041	1,47 (1,22–1,79) <i>p</i> ₁ =0,034 <i>p</i> ₂ =0,021 <i>p</i> ₃ =0,044	1,72 (1,20–2,21) <i>p</i> ₁ =0,012 <i>p</i> ₂ =0,041 <i>p</i> ₃ =0,044

Примечание: *p*₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; *p*₂ – у больных ИТБ; *p*₃ – у больных ДТБ.

Данный факт позволяет предположить, что при ТБ, особенно в случае распространенных деструктивных форм заболевания, сопровождающихся туберкулиновой анергией и лекарственной резистентностью возбудителя, баланс между факторами супрессии и активации иммунного ответа сдвигается в негативную сторону. Этот эффект может быть обусловлен не только увеличением количества регу-

ляторных $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток, но и повышением их функциональной активности, связанной с подавлением процесса клональной пролиферации лимфоцитов. В подтверждение этому корреляционный анализ позволил установить наличие отрицательной линейной зависимости между количеством $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ клеток в крови у больных ТБ и пролиферативной активностью лимфоцитов, как спонтанной ($r = -0,72$; $p < 0,05$), так и PPD-индуцированной ($r = -0,71$; $p < 0,05$).

Рядом исследователей было продемонстрировано, что у $CD8^+$ Т-клеток можно индуцировать супрессивные свойства [Мейл Д. и соавт., 2007; Collison L. et al., 2007]. Подобно $CD4^+CD25^{hi}$ клеткам, $CD8^+$ регуляторные Т-клетки могут экспрессировать внутриклеточный транскрипционный фактор *Foxp3*. Они снижают уровень экспрессии костимулирующих молекул на дендритных и эндотелиальных клетках. Это в свою очередь индуцирует иммунологическую толерантность (анергию). Однако для осуществления супрессорной функции $CD8^+$ Т-лимфоциты должны быть примированы $CD4^+$ Т-клетками при первичном иммунном ответе, в результате чего они становятся способными супрессировать вторичный иммунный ответ. При этом $CD8^+$ регуляторные Т-клетки могут подавлять как Th1-, так и Th2-ответ, а также контролировать ответ $CD4^+$ Т-клеток на суперантиген и супрессировать иммунный ответ посредством секреции цитокинов, включая интерферон (IFN) γ , IL-6 и IL-10 [Мейл Д. и соавт., 2007; Murray P. J., 2005].

В ходе проведенных исследований нами установлено выраженное увеличение численности регуляторных Т-клеток с иммунофенотипом $CD3^+CD4^-CD25^+$ при всех клинических формах ТБ (табл. 2). Отметим, что в случае ИТБ и ДТБ их количество было выше по сравнению с контрольной группой в 2 и 2,5 раза соответственно, в то время как при ФКТБ оно было значительно ниже, чем у больных ТБ с иными клиническими формами заболевания, хотя и превышало аналогичный параметр в группе здоровых индивидов. Увеличение количества $CD4^-$ регуляторных Т-клеток в острый период ТБ, по всей видимости, имеет неблагоприятное значение, поскольку является дополнительным иммуносупрессорным механизмом, способствующим дальнейшему распространению инфекции и хроническому течению заболевания. Кроме того, корреляционный анализ показал наличие отрицательной линейной зависимости между количеством $CD3^+CD4^-CD25^+$ клеток в крови больных ТБ и спонтанным пролиферативным ответом лимфоцитов *in vitro* ($r = -0,83$; $p < 0,05$). То есть увеличение содержания $CD4^-$ регуляторных Т-клеток, равно как и числа $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ Treg, способствует угнетению бласттрансформации лимфоцитов и в дальнейшем может привести к снижению клональной пролиферации эффекторных Т-клеток в целом.

Известно, что клеточный иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими лимфоцитами (CTL), более агрессивен, чем воспалительный иммунный ответ $CD4^-$ лимфоцитов, и приводит к массивной гибели инфицированных клеток. Предполагается, что $CD8^+$ (т.е. $CD4^-$ регуляторные) Т-клетки супрессируют именно цитотоксический ответ, однако исчерпывающих сведений по этому вопросу на сегодня нет [Maizels R.M., Smith K.A., 2011; Ohkura N., Sakaguchi S., 2011; Yamazaki S. et al., 2008].

Показательно, что у больных ТБ с отрицательной реакцией Манту независимо от клинической формы заболевания нами было зарегистрировано более высокое содержание $CD3^+CD4^-CD25^+$ клеток по сравнению с туберкулин-положительными

пациентами. При этом у туберкулиннегативных лиц, страдающих ДТБ и ФКТБ, данный параметр был практически в 5 раз выше, чем у лиц с положительной пробой Манту.

В случае МЛУ ТБ нами установлены не столь однозначные закономерности. Так, при МЛУ ДТБ численность $CD3^+CD4^-CD25^+$ клеток оказалась в 3 раза выше, чем при ЛЧ ДТБ. В то же время при ИТБ и ФКТБ, напротив, в случае ЛЧ МТБ численность $CD4^-$ негативных регуляторных Т-клеток в 2 раза превышала таковую при МЛУ-вариантах заболевания.

Идентифицированная нами популяция $CD4^-$ негативных регуляторных Т-клеток, так же как и популяция $CD4^+$ позитивных регуляторных Т-клеток, является гетерогенной и может включать в себя как $CD3^+CD8^+$ цитотоксические регуляторные Т-лимфоциты, так и двойные негативные (DN) «ранние» $CD4^-CD8^-$ регуляторные Т-клетки [Ohkura N., Sakaguchi S., 2011; Sakaguchi S., 2011; Vignali D.A. et al., 2008]. Аналогично $CD4^+$ регуляторным Т-клеткам $CD8^+$ регуляторные Т-клетки могут дифференцироваться как в тимусе, так и на периферии в ходе иммунного ответа, при этом основным медиатором, инициирующим этот процесс, является IL-10. Не исключается также образование $CD8^+$ регуляторных Т-клеток из $CD8^+$ CTL-лимфоцитов [Vignali D.A. et al., 2008; Мейл Д. и соавт., 2007; Mills K. H. G., McGuirk P., 2004].

Выше мы отмечали, что основной функцией Treg является обеспечение *периферической* иммунологической толерантности к аутоантигенам. Тем не менее и в обеспечении *центральной* толерантности им отведена определенная роль [Yun W.-J. et al., 2010; Мейл Д. и соавт. 2007; Chrobák P., 2003], которая, возможно, опосредована, в том числе, и двойными негативными $CD4^-CD8^-$ регуляторными Т-клетками. Известно, что DN – это незрелые Т-клетки, поступающие в тимус, которые не экспрессируют корецепторные молекулы CD4 и CD8 и составляют около 3 % всех тимоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2009; Мейл Д. и соавт., 2007]. Примечательно, что в периферической крови DN-клетки встречаются крайне редко, поэтому мы можем лишь предполагать, что двойные негативные тимоциты входят в состав исследованной нами субпопуляции $CD3^+CD4^-CD25^+$ регуляторных Т-клеток.

Как известно, естественные Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ и адаптивные регуляторные $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ Т-лимфоциты являются ключевыми клетками-супрессорами иммунного ответа [Sakaguchi S., 2011; Ito Y. et al., 2009]. Анализ количества *Foxp3*-позитивных регуляторных Т-клеток показал, что у всех пациентов с ТБ независимо от клинической формы заболевания устанавливается повышение числа $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg по сравнению с группой здоровых лиц, в то время как количество $CD25^-$ негативных регуляторных Т-клеток, содержащих молекулу *Foxp3*, возрастает только у больных ФКТБ (табл. 2). Данный факт позволяет предположить, что в случае хронического деструктивного процесса в Treg-опосредованной специфической иммуносупрессии задействованы регуляторные Т-клетки, как естественные, так и образованные в ходе адаптивного иммунного ответа.

Туберкулез, за исключением остро прогрессирующих форм, принято считать «медленной» инфекцией, особенностью которой является длительно протекающий, но, к сожалению, неэффективный иммунный ответ на фоне избытка постоян-

но персистирующего антигена. Продемонстрированное нами снижение численности Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ при всех клинических формах ТБ может быть обусловлено выявленным дефицитом продукции ИЛ-2 и, как следствие, угнетением не только пролиферации, но и дифференцировки Th0 в антиген-специфические активированные Th1-лимфоциты.

Как показали проведенные нами исследования, количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов в крови больных ИТБ и ДТБ вне зависимости от реакции Манту и лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП до начала специфической терапии, т.е. в острую фазу туберкулезной инфекции, возрастает относительно такового у здоровых доноров, так же как и в целом по группам. Схожая картина отмечалась при МЛУ ФКТБ и у больных ФКТБ с положительной пробой Манту.

По-видимому, такие изменения изначально способствуют формированию супрессии Th1-ответа с целью предотвращения развития гиперергических иммунных реакций и повреждения ткани легких. Так, например, в исследованиях S. Raghvan (2005) и D.C. Lee (2010) была показана сдерживающая роль Treg в развитии иммунного воспаления и иммунопатологии, сопровождающей различные инфекционные процессы [Lee D.C. et al., 2010; Webster K.E. et al., 2009; Raghvan S., Holmgren J., 2005]. Однако в конечном итоге эта в определенной степени компенсаторная реакция, связанная с усиленной пролиферацией и дифференцировкой Treg, приводит к негативным последствиям в виде ослабления эффективности протективного иммунитета, способствуя генерализации и хронизации инфекции [Vignali D.A. et al., 2008; Vahlenamp T.W. et al., 2005].

Очевидно, что повышение численности $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg в крови у больных ТБ является неблагоприятным фактором. Основным путем реализации эффекта Treg является тройное контактное взаимодействие, в которое наряду с Treg и клетками-мишенями вовлекаются толерогенные дендритные клетки (ТДК) [Sakaguchi S., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Klein S. et al., 2011; Vignali D.A. et al., 2008]. Возможно, Treg препятствуют формированию иммунного синапса между ТДК и эффекторной Т-клеткой. Допускается, что в основе этого механизма лежит конкурентное взаимодействие негативного активатора CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-1*) с костимулирующими молекулами В7 (CD80/86) на поверхности клеток-мишеней, способствующее формированию Т-клеточной анергии [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Таким образом, возрастающее количество Treg практически при всех клинических формах и вариантах течения ТБ позволяет предположить, что именно они осуществляют главную иммуносупрессорную функцию при туберкулезной инфекции.

Известно, что Treg-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ «обучаются» в тимусе на этапе негативной селекции и покидают тимус как популяция естественных Treg, обладающая максимальной супрессорной активностью. Наряду с этим, Н.С. Dujardin et al. (2004) показали, что субпопуляция $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg пополняется в периферическом отделе иммунной системы за счет их развития из $CD4^+CD25^-$ Т-клеток (конверсия Т-хелперов в регуляторные Т-клетки) вследствие межклеточных взаимодействий с участием костимулирующих молекул при действии TGF- β и в присутствии ТДК [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Cupedo T. et al., 2005; Toubi E. et al., 2005; Dujardin H.C. et al., 2004]. Проявлением конверсии является экспрессия молекулы Foxp3

внутри клетки, а также молекул CD25 и CTLA-4 на ее поверхности [Ярилин А.А., 2010].

В связи с изложенным логично предположить, что у больных ТБ достаточно высокое количество адаптивных регуляторных Т-клеток в крови обусловлено не только активацией межклеточных взаимодействий, но и продемонстрированной нами усиленной продукцией цитокина-индуктора Treg – TGF- β . Отметим также, что источником CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-клеток при этом могли быть CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Т-хелперы, дифференцирующиеся в тимусе и образующие резервный пул для формирования CD25⁺ Treg-лимфоцитов [Klein S. et al., 2011; Dargasse-Jèze G. et al., 2009; 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 , так как экспрессии маркера *Foxp3* в большей степени способствует TGF- β , чем IL-10, хотя и сами CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-лимфоциты способны секретировать как IL-10, так и TGF- β [Maizels R.M., Smith K.A., 2011; Sakaguchi S., 2011; Симбирцев А.С., 2011; Ярилин А.А., 2010; Pop S. et al., 2005].

При оценке количества регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ у туберкулинотрицательных больных ДТБ и ФКТБ показано его увеличение относительно контрольных значений. При этом у больных с положительной реакцией Манту значения данного параметра были ниже таковых у больных с отрицательной реакцией Манту вне зависимости от формы ТБ, что может быть связано со способностью индуцированных регуляторных Т-клеток косвенно влиять на формирование туберкулиновой анергии. Кроме того, нами выявлено увеличение численности CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток у больных с МЛУ ТБ по сравнению с лекарственно-чувствительным вариантом заболевания при ИТБ и ФКТБ.

Вероятно, это могло быть индуцировано самими микобактериями. Так, Л.В. Сахно и соавт. (2004) предположили, что штаммы микобактерий, резистентные к стандартной химиотерапии, обладают особыми свойствами в отношении индукции CD4⁺CD25^{hi} регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью [Сахно Л.В. и соавт., 2004]. Таким образом, нельзя исключить тот факт, что при МЛУ ТБ, с одной стороны, происходит активация механизмов иммунносупрессии как за счет естественных, так и за счет адаптивных регуляторных Т-клеток, с другой стороны, лекарственно-устойчивые штаммы МБТ могут способствовать угнетению иммунного ответа посредством индукции Treg.

Известно, что главными клетками-мишенями воздействия Treg являются активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки – основные эффекторные клетки противотуберкулезного иммунитета. Наивные Т-клетки более чувствительны к действию Treg, чем Th1- и Th2-лимфоциты [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Sakaguchi S. et al., 2008; Rase 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 ТБ и в отсутствие взаимосвязи с лекарственной чувствительностью МБТ к ПТП по сравнению с группой здоровых доноров, по всей видимости, может быть обусловлено угнетением IL-2-зависимой пролиферации и

дифференцировки Т-хелперов, а также влиянием регуляторных $Foxp3^+$ Т-клеток, обладающих супрессорной активностью и способных оказывать воздействие на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты путем непосредственного контакта «cell-to-cell». При этом нужно заметить, что у туберкулинположительных больных ФКТБ зафиксировано более низкое количество Т-клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ по сравнению с туберкулинотрицательными пациентами этой же группы.

В то же время снижение содержания $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ Т-лимфоцитов в периферической крови в условиях абсолютной и относительной лимфоцитопении в целом можно рассматривать как проявление Т-клеточного иммунодефицита, связанного либо с изначальной дезинтеграцией иммунной системы у больных ТБ, либо с формированием иммунологической недостаточности на фоне туберкулезной инфекции.

Известно, что в случае действия Трег-лимфоцитов контактзависимым способом на $CD4^+$ -клетки сами клетки-мишени приобретают супрессорные функции: у них появляется способность секретировать TGF- β и IL-10, подавляя таким образом пролиферативную и секреторную активность вторичных мишеней [Dieckmann D. et al., 2005]. В свете показанных изменений и учитывая данные литературы, очевидно, что поддержание эффективного иммунного ответа в такой ситуации становится невозможным, что неизбежно ведет к утяжелению течения ТБ, а также не исключает формирования у туберкулинположительных пациентов туберкулиновой анергии в дальнейшем [Виноградова Т.И. и соавт., 2009; Перельман М.И., 2007; Сахно Л.В. и соавт., 2004].

Туберкулиновая анергия у больных ТБ ассоциирована не только с МЛЮ *M. tuberculosis*, как продемонстрировано нами в ходе проведенных исследований, но и с увеличением количества регуляторных Т-клеток в крови на фоне неспецифической супрессии, проявляющейся в угнетении пролиферации Th1-лимфоцитов [Сахно Л.В. и соавт., 2006, 2004; Инсанов А. Б., 2005; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001]. Данный факт подтверждается наличием отрицательной взаимосвязи между количеством Трег и показателями спонтанной ($r = -0,6$; $p < 0,05$) и индуцированной PPD ($r = -0,7$; $p < 0,05$) пролиферации лимфоцитов крови у больных ТБ с положительной реакцией на туберкулин вне зависимости от клинической формы заболевания. Это является еще одним доказательством того, что именно Трег-клетки оказывают негативный эффект на пролиферацию лимфоцитов и опосредуют механизмы формирования иммуносупрессии при ТБ. При этом имеются данные, указывающие на сопряженность туберкулиновой анергии с Т-клеточной анергией, а также с более тяжелым характером течения ТБ [Сахно Л.В. и соавт., 2010, 2004; Перельман М.И., 2007; Valikó Z. et al., 1998].

Регуляция иммунного ответа является сложным и многокомпонентным процессом, при этом попытка отделить врожденный иммунитет от адаптивного выглядит, по меньшей мере, искусственной [Ярилин А.А., 2010; Бурместер Г.-Р., Пецутто А., 2009; Мейл Д. и соавт., 2007]. $\gamma\delta$ Т-клетки впервые были описаны в середине 1980-х годов Saito et al. (1984) и Brenner et al. (1986) как гетерогенная субпопуляция Т-клеток с Т-клеточным рецептором, состоящим из γ - и δ - цепей ($\gamma\delta$ TCR) [Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М., 2009]. Принято считать, что эта минорная МНС-нерестриктированная субпопуляция Т-лимфоцитов сочетает в себе свойства клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Относительно недав-

но $\gamma\delta$ T-клетки рядом авторов были отнесены к естественным регуляторным T-клеткам [Хаитов Р.М. и соавт., 2011].

Анализируя количество $\gamma\delta$ T-клеток в крови у больных ТБ в острую фазу заболевания до назначения специфической химиотерапии, мы установили его снижение по сравнению с контрольной группой при ИТБ, ДТБ и ФКТБ в 1,5, 2 и 3 раза соответственно (табл. 2). Показано, что у пациентов с отрицательной пробой Манту при ИТБ количество $\gamma\delta$ T-клеток в 2,5 раза ниже, чем у туберкулинположительных больных ИТБ, и в 4 раза ниже, чем у здоровых доноров. При ДТБ и ФКТБ наблюдалась противоположная картина, – у туберкулинотрицательных больных численность $\gamma\delta$ T-клеток оказалась сопоставимой с показателями в группе здоровых лиц и выше, чем у туберкулинположительных пациентов. При этом в случае МЛУ ИТБ количество $\gamma\delta$ T-клеток было ниже, чем при ЛЧ ИТБ. У больных ДТБ, напротив, при МЛУ-варианте заболевания численность $\gamma\delta$ T-лимфоцитов повышалась по сравнению с ЛЧ ДТБ. Что касается ФКТБ, то в данном случае количество $\gamma\delta$ T-клеток не изменялось в зависимости от чувствительности *M. tuberculosis* к ПТП.

То немногое, что в настоящее время известно о $\gamma\delta$ T-лимфоцитах и биологических функциях этой популяции T-клеток, позволяет предположить, что приоритетная роль принадлежит эффектам действия $\gamma\delta$ T-клеток на уровне системы мукозального иммунитета (иммунитета слизистых оболочек) и осуществлении ими функции так называемых «местных киллеров» или клеток первой линии защиты [Witherden D.A., Navran W.L., 2011; Bonneville M., Fournie J., 2005; Carding S., Egan P., 2002]. При проникновении *M. tuberculosis* в организм человека в первую очередь инициируется мукозальный иммунный ответ в лимфоидной ткани респираторного тракта, после чего возможна миграция альвеолярных макрофагов и дендритных клеток в регионарные лимфатические узлы и развитие во вторичных лимфоидных органах специфического иммунного ответа с формированием эффекторных клеток и клеток памяти. То есть иммунный ответ на патоген разворачивается в нескольких местах, соединенных между собой путями рециркуляции (миграции) [Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Master S. et al., 2008; Мейл Д. и соавт., 2007].

Выявленный нами дефицит циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у больных ТБ может быть обусловлен пополнением пула резидентных (BALT-ассоциированных) $\gamma\delta$ T-клеток в ткани респираторного тракта для поддержания локального иммунного ответа, репарации и интегративности альвеолярного эпителия [Witherden D.A., Navran W.L., 2011; Morita C. et al., 2007]. С другой стороны, гибель циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток можно связать с активацией антигениндуцированного рецепторного апоптоза при деструктивных формах ТБ, в том числе и опосредованного иммуносупрессорными эффектами регуляторных T-клеток.

У пациентов с ТБ минимальное количество циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток было зафиксировано у больных ИТБ с отрицательной реакцией Манту, а также в случае МЛУ ИТБ. Не исключается, что в отсутствие эффективного протективного иммунного ответа на фоне ограниченных возможностей применения ПТП у данных больных в дальнейшем это может привести к быстрому распаду туберкулезных инфильтратов и диссеминации инфекции [Виноградова Т.И. и соавт., 2009; Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008; Перельман М.И., 2007].

Интересен тот факт, что при ДТБ и ФКТБ у туберкулиннегативных пациентов и у пациентов с МЛУ МБТ в случае диссеминированного ТБ численность циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток не отличалась от таковой у здоровых доноров. Вполне вероятно, что при тяжелых и осложненных вариантах течения ТБ количество резидентных $\gamma\delta$ T-клеток в респираторном тракте уже не играет принципиальной «защитной» роли и они частично мигрируют в циркуляцию. С другой стороны, фосфоантигены микобактерий являются активаторами $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, при этом для ДТБ и ФКТБ в большинстве случаев характерна бактериемия. Следовательно, присутствие $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови в этой ситуации необходимо для «сдерживания» распространяющейся инфекции. Кроме того, проведенный корреляционный анализ показал наличие положительной линейной зависимости между количеством $\gamma\delta$ T-клеток в крови больных ТБ и спонтанной ($r = 0,88$; $p < 0,05$) и РРД-индуцированной ($r = 0,83$; $p < 0,05$) пролиферацией лимфоцитов.

Таким образом, логично предположить, что пополнение пула циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у больных МЛУ ТБ и пациентов с отрицательной реакцией Манту в определенной степени является компенсаторным механизмом, который способствует оптимальному функционированию иммунной системы в сложившихся неблагоприятных условиях. Что касается иммуносупрессорной функции $\gamma\delta$ T-клеток, то при туберкулезной инфекции она, по-видимому, не является основной и обеспечивается другими популяциями регуляторных Т-клеток.

Т-клетки памяти – эффекторы вторичного иммунного ответа на *M. tuberculosis*

Оценка оперативности и эффективности вторичного иммунного ответа на презентруемый антиген, безусловно, связана с определением количества иммуномемориальных $CD45R0^+$ Т-клеток. Фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти принято считать появление на их поверхности изоформы $CD45R0$ взамен изоформы $CD45RA$. Кроме того, молекула $CD45R0$ является поверхностным маркером ряда субпопуляций Т-хелперов, в том числе Т-хелперов активированных и адаптивных регуляторных Т-клеток [Ohara T. et al., 2002].

В ходе проведенных исследований установлено, что при ИТБ и ДТБ количество $CD45R0^+$ Т-клеток памяти не отличается от аналогичного параметра у здоровых доноров, в то время как при ФКТБ их количество в 1,5 раза превышает контрольные значения.

Комментируя вышеуказанные изменения, отметим, что в случае ФКТБ увеличение количества Т-клеток памяти, во-первых, связано с длительной циркуляцией *M. tuberculosis* в крови больных и соответственно с перманентным пополнением пула «истинных» $CD45R0^+$ Т-лимфоцитов, образующихся под влиянием антигенного распознавания и специфического иммунного ответа. Во-вторых, выявленная нами лимфоцитопения, особенно выраженная у больных ФКТБ и сопровождающаяся гипопродукцией IL-2, является фактором, инициирующим процесс гомеостатической пролиферации лимфоцитов, в ходе которой происходит поликлональная индукция Т-клеток с одновременной экспрессией на их поверхности

молекулы CD45R0 (в данном случае принято говорить о «суррогатных» Т-клетках памяти) [Хайтов Р.М. и соавт., 2011; Ярилин А.А., 2010; Allen A.J. et al., 2009, Козлов В.А., 2006].

Установлено, что помимо классического пути формирования Т-клеток памяти существует механизм образования фенотипически сходных клеток, образующихся в процессе гомеостатической пролиферации, т.е. пролиферации, вызванной не антигенной стимуляцией, а снижением содержания в организме общего пула Т-лимфоцитов [Ярилин А.А., 2010; Козлов В.А., 2006].

Более интересными представляются изменения количества CD45R0⁺ Т-клеток, выявленные нами у больных ТБ в зависимости от реакции на внутрикожное введение туберкулина и лекарственной чувствительности МБТ к ПТП. Так, в группе больных с отрицательной реакцией Манту количество Т-клеток памяти было ниже, чем у туберкулинположительных пациентов в 2,5 раза при ИТБ и в 4 раза при ДТБ. У больных с МЛУ ИТБ и ФКТБ количество Т-клеток памяти превышало не только контрольные значения, но и их численность у пациентов с ЛЧ-вариантами соответствующих клинических форм заболевания. При ЛЧ ДТБ, напротив, количество иммуномемориальных Т-лимфоцитов оказалось выше в сравнении с МЛУ ДТБ и не отличалось от контрольных значений.

Напомним, что отрицательная реакция Манту у больных с верифицированным диагнозом ТБ свидетельствует о неэффективности вторичного иммунного ответа на *M. tuberculosis* и сопряжена с Т-клеточной анергией. С этой точки зрения снижение численности CD45R0⁺ Т-клеток памяти у туберкулиннегативных пациентов является вполне закономерным и обоснованным, так как именно данная популяция Т-лимфоцитов играет ключевую роль в ускоренной презентации антигена и реализации вторичного ответа.

Известно, что в процессе презентации антигена Т-клетки памяти могут быть активированы любыми антигенпрезентирующими клетками (АПК) в отличие от наивных CD45RA⁺ Т-клеток, которые активируются исключительно дендритными клетками [Ярилин А.А., 2010; Sereti I. et al., 2005; Uehara T. et al., 1992]. Не вызывает сомнений, что дефицит иммуномемориальных Т-клеток при отсутствии реакции на внутрикожное введение туберкулина у пациентов с ТБ является негативным фактором в аспекте прогнозирования исходов заболевания. Обнаруженное нами увеличение численности Т-клеток памяти в группах больных МЛУ ИТБ и ФКТБ может быть связано либо с активацией процесса гомеостатической пролиферации, причины и механизм которой рассмотрены выше, либо с наличием определенных иммуномодулирующих свойств у лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, активирующих вторичный иммунный ответ. Однако это лишь предположение, требующее дальнейшего детального исследования.

В ряде работ показано, что Трег-клетки, так же как и Т-клетки памяти, экспрессируют молекулу CD45R0. Особенно важным представляется, что регуляторной функцией обладают только те субпопуляции CD25⁺ Т-клеток, которые несут на своей поверхности маркер CD45R0 [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Vignali D.A. et al., 2008; Мейл Д. и соавт., 2007; Sereti I. et al., 2005]. В свете изложенного, еще одной причиной роста численности CD45R0⁺ Т-клеток при МЛУ ТБ может быть увеличение их количества за счет различных субпопуляций регуляторных Т-клеток.

Прогноз множественной лекарственной устойчивости у больных туберкулезом легких

Для построения модели прогноза МЛУ и ЛЧ у пациентов с ТБ был использован дискриминантный анализ [Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., 2002]. Решающие правила (дискриминантные функции) представляли собой линейные классификационные функции вида

$$d_j(x_1, x_2, \dots, x_n) = b_{0,j} + b_{1,j}x_1 + b_{2,j}x_2 + \dots + b_{n,j}x_n,$$

где d_j – линейная дискриминантная функция для j -й группы пациентов; $b_{0,j}$ – константа для j -й линейной дискриминантной функции; $b_{1,j}, b_{2,j}, \dots, b_{n,j}$ – коэффициенты для признаков x_1, x_2, \dots, x_n в j -й линейной дискриминантной функции; x_1, x_2, \dots, x_n – значения признаков классифицируемого пациента.

Для решения задачи прогноза по измеренным у пациента иммунологическим показателям производился расчет дискриминантных функций, соответствующих МЛУ ТБ и ЛЧ ТБ (табл. 3). Пациента относили к той группе, для которой линейная дискриминантная функция принимала максимальное значение. При проведении расчетов использовался пакет прикладных программ Statistica 6.0 [Реброва О.Ю., 2002].

Качество диагностики состояния по построенным решающим правилам представлено в табл. 4.

Таблица 3

Коэффициенты линейных дискриминантных функций ($F(4,25) = 4,50; p < 0,0071$)

Показатели	Коэффициенты $b_{j,i}$	
	d_1 (группа ЛЧ ТБ)	d_2 (группа МЛУ ТБ)
Константа, $b_{j,0}$	-14,0015	-22,6954
Показатели, x_i		
CD45R0 ⁺ , %	-0,0626	-0,1710
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻ : Th, %	0,5181	0,6689
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , %	2,4285	3,1202
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ , %	0,2255	0,3229

Таблица 4

Классификационная матрица результатов дискриминантного анализа

Вариант течения туберкулеза легких	Прогноз варианта течения туберкулеза легких по использованной модели		% правильного прогноза
	ЛЧ ТБ	МЛУ ТБ	
ЛЧ ТБ	15	3	83,3
МЛУ ТБ	2	10	83,3
Всего	17	13	83,3

Обучающую выборку составили 12 пациентов с МЛУ ТБ и 18 – с ЛЧ ТБ. У каждого пациента были определены 10 иммунологических показателей, характеризующих количественный состав иммунокомпетентных клеток крови в целом, а также субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток. Лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* к ПТП определяли методом абсолютных концентраций. Клиническую форму ТБ устанавливали на основании данных рентгенологического исследования легких. При этом пациенты объединялись в группы с ЛЧ ТБ и МЛУ ТБ независимо от формы заболевания, поскольку, по данным ряда авторов, риск развития МЛУ не зависит от клинической формы ТБ [Маркелов Ю.М., Нарвская О.В., 2010; Перельман М.И., 2007; Коровкин В.С., 2003].

В результате применения процедуры пошагового дискриминантного анализа из 10 исходных показателей были построены правила классификации, включающие 4 наиболее информативных показателя, представленных в табл. 3. Их использование позволяет прогнозировать вариант течения ТБ с вероятностью более 83 %. Интересно отметить, что в числе наиболее информативных показателей оказались $CD45R0^+$ Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки с иммунофенотипами $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$, а также $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперы.

Наряду с пошаговым дискриминантным анализом была также построена прогностическая модель методом многомерной логистической регрессии (табл. 5), в которой нами были учтены все 10 иммунологических показателей:

$$p = \frac{\exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)}{1 + \exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)},$$

где p – вероятность отнесения пациента к одной из двух групп (ЛЧ или МЛУ); b_0 – константа; b_1, b_2, \dots, b_n – коэффициенты для признаков x_1, x_2, \dots, x_n .

Результаты моделирования представлены в табл. 5, 6. Видно, что логистическая модель дает в целом такое же качество правильного прогноза, как и дискриминантная, однако вероятность правильного прогноза для ЛЧ ТБ несколько более высокая по сравнению с МЛУ ТБ.

Таблица 5

Коэффициенты логистической регрессии ($\chi^2(10) = 17,33$; $p = 0,0674$)

Показатели	b_i
Константа, b_0	-8,191
Показатели, x_i	
$CD4^+CD25^+Foxp3^-$, %	0,064
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$, %	0,102
$CD4^+CD25^-Foxp3^+$, %	-0,038
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	-0,268
Лимфоциты, %	0,021
$CD3^+CD4^-CD25^+$, %	-0,365
$CD3^+CD4^+CD25^{hi}$, %	-0,706
$CD3^+CD4^+CD25^-$: Th, %	0,149
$\gamma\delta$ Т-лимфоциты, %	-0,011
$CD45R0^+$ Т-клетки, %	-0,135

Классификационная матрица результатов логистической регрессии

Вариант течения туберкулеза легких	Прогноз варианта течения туберкулеза легких по использованной модели		% правильного прогноза
	ЛЧ ТБ	МЛУ ТБ	
ЛЧ ТБ	16	2	88,9
МЛУ ТБ	3	9	75,0
Всего	19	11	83,3

Следует заметить, что хотя представленные прогностические модели получены нами на обучающей выборке сравнительно небольшого объема, анализ результатов моделирования позволяет сделать вывод, что использование данного комплекса иммунологических показателей для прогноза МЛУ и ЛЧ при ТБ может оказаться перспективным и эффективным методом выявления больных ТБ, предрасположенных к формированию МЛУ *M. tuberculosis* к ПТП.

В то же время нельзя не отметить, что в случае использования дискриминантной модели прогноза МЛУ ТБ мы можем ограничиться четырьмя выявленными нами наиболее информативными параметрами иммунного статуса. Это принципиально важно в плане методологического аспекта осуществления прогноза МЛУ у больных ТБ, так как данная модель позволит значительно сократить временные и финансовые затраты на проведение обследования пациента.

Активация апоптоза и угнетение пролиферации лимфоцитов как иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-клеток при множественно лекарственно-устойчивом туберкулезе легких

Одна из функций регуляторных Т-клеток – активация апоптоза. В данном случае механизмы апоптоза используются для регуляции развития тимоцитов, формирования «репертуара» Т-клеток, их селекции и для координации событий, ведущих к иммунному ответу на периферии – эндогенный (митохондриальный) апоптоз [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Pandiyan P. et al., 2007]. В то же время при помощи перфорин/гранзимных путей Treg могут управлять адаптивным иммунным ответом [Maizels R.M., Smith K.A., 2011; Giovannetti A. et al., 2008].

Несомненный интерес представляют полученные нами данные относительно апоптоза и пролиферации лимфоцитов крови в зависимости от клинической формы ТБ и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к ПТП. Примечательно, что при оценке указанных параметров наиболее показательные их изменения были зарегистрированы у больных ДТБ – резкое повышение количества апоптотических лимфоцитов в крови на фоне снижения числа пролиферирующих лимфоидных клеток. При ИТБ численность лимфоцитов, вступивших в апоптоз, лишь несколько возросла, а при ФКТБ и вовсе не отличалась от аналогичного параметра у здоровых лиц.

По-видимому, это объясняется тем, что ДТБ является ареактивной клинической формой заболевания, для которой характерно выраженное угнетение антигенспецифического Th1-иммунного ответа и активация апоптоза Th1-лимфоцитов.

Вероятно, в такой ситуации усиливается метаболическая активность В-лимфоцитов за счет повышения продукции цитокинов Treg- и Th2-профиля, в том числе IL-4, IL-10, TGF- β , обладающих проапоптотической и иммуносупрессорной активностью, что приводит к включению гуморальных механизмов иммунного ответа и, как следствие, к отрицательной клинической динамике заболевания [Симбирцев А.С., 2011; Ярилин А.А., 2010; Барри Р. Блум, 2002].

Кроме того, по данным М. Aleman et al. (2002), активация циркулирующих моно- и полиморфноядерных лейкоцитов, полученных от больных с активными формами ТБ, к которым, несомненно, относится ДТБ, ассоциируется с индукцией рецепторного апоптоза данного типа клеток. Авторы установили, что биологические эффекты МБТ проявляются ускорением апоптоза моноклеарных лейкоцитов и гранулоцитов и предположили наличие взаимосвязи данного факта с процессами избыточной активации макрофагов и колонизации их *M. tuberculosis* [Aleman M. et al., 2002].

Установлено, что Treg могут подавлять иммунный ответ на любой его стадии, активируя апоптоз и угнетая пролиферацию практически всех идентифицированных на сегодня клонов Т-хелперов [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Sakaguchi S., 2011; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011]. В подтверждение этому отметим, что анализ взаимосвязей между количеством CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток и показателями пролиферации и апоптоза лимфоцитов крови у больных ТБ показал наличие отрицательной корреляции между численностью Treg и пролиферирующих клеток ($r = -0,68$; $p < 0,05$) и положительной корреляции между численностью Treg и клеток, вступивших в апоптоз ($r = 0,68$; $p < 0,05$). Аналогичные взаимосвязи были установлены между количеством CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}, а также CD8⁺ регуляторных Т-клеток и количеством пролиферирующих и апоптотических лимфоцитов крови ($r = -0,89$; $p < 0,05$ и $r = 0,89$; $p < 0,05$ соответственно).

Интересно, что совершенно противоположная картина отмечалась при анализе взаимосвязей между содержанием $\gamma\delta$ Т-клеток в крови больных ТБ и показателями пролиферации и апоптоза лимфоцитов крови. Так, между количеством $\gamma\delta$ Т- и пролиферирующих клеток устанавливалась сильная положительная линейная зависимость ($r = 0,92$; $p < 0,05$), в то время как между количеством $\gamma\delta$ Т-клеток и клеток, вступивших в апоптоз, обнаруживалась сильная отрицательная корреляция ($r = -0,92$; $p < 0,05$).

Продемонстрированные взаимосвязи позволяют сделать заключение, что хотя $\gamma\delta$ Т-клетки весьма чувствительны к апоптозу, сами они, возможно, являются позитивными активаторами иммунного ответа, т.е. индуцируют пролиферацию и подавляют апоптоз иммунокомпетентных клеток. Однако об этой предположительной функции $\gamma\delta$ Т-клеток на сегодня данных нет.

В дополнение к изложенному о Treg следует отметить, что адаптивные Treg преимущественно экспрессируют гранзим В и могут лизировать клетки-мишени перфоринзависимым путем, в то же время естественные активированные Treg экспрессируют гранзим А и молекулу CD95, то есть они оказывают свое регулирующее влияние через супрессию, обусловленную цитотоксической активностью и Fas/FasL-индуцированным апоптозом [Maizels R.M., Smith K.A., 2011; Мейл Д. и соавт., 2007; Pandiyan P. et al., 2007]. Также нами показано увеличение численно-

сти апоптотических клеток на фоне снижения количества пролиферирующих лимфоцитов у пациентов с МЛУ ТБ, вероятно, за счет способности лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* к активации апоптоза иммунокомпетентных клеток и угнетению иммунного ответа посредством индукции Treg на периферии [Сахно Л. В. и соавт., 2004; Grossman W.J. et al., 2004].

Таким образом, полученные нами данные при исследовании апоптоза и пролиферации лимфоцитов крови при ТБ можно охарактеризовать неоднозначно. С одной стороны, мы можем рассматривать активацию апоптоза при ДТБ как фактор угнетения клональной экспансии и дифференцировки антигенспецифических Th1-лимфоцитов либо связать ее с индукцией гибели клеток антигенами МБТ, равно как и с реализацией описанных выше иммуносупрессорных эффектов Treg-лимфоцитов. С другой стороны, в случае избытка антигена при ДТБ, возможно, активируется и экзогенный (рецепторный) апоптоз Т-лимфоцитов, выступающий как механизм ограничения гиперактивации антигенспецифических клонов эффекторных клеток.

Отсутствие выраженных изменений в показателях программированной гибели и пролиферации лимфоцитов крови при ФКТБ, скорее всего, объясняется инактивацией рецепторного апоптоза вследствие анергии клеток-эффекторов иммунного ответа на фоне длительного хронического течения инфекционного процесса.

Напомним, что ФКТБ характеризуется значительным снижением количества и функциональной активности всех клеток-участников иммунного ответа на микобактериальные антигены, в том числе различных субпопуляций Т-лимфоцитов (в том числе Th1, Th2, Th-активированных), В-лимфоцитов, а также моно- и полиморфноядерных лейкоцитов, что свидетельствует о формировании частичной либо полной иммунологической толерантности на воздействие антигенного стимула [Nandi B., Behar S.M., 2011; Левашов Ю.Н., Репин Ю. М., 2008; Перельман М.И., 2007; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. Возможно, что у обследованных нами больных ФКТБ значительно индуцирована иммунологическая толерантность к *M. tuberculosis*, связанная со стабильной рециркуляцией антигена в организме. В этом случае логично предположить включение негативных активаторов сигнальной трансдукции (CD39, CD73, CD152), блокирующих рецепторный апоптоз [Deaglio S. et al., 2007; Kasprowicz D.J. et al., 2003].

Вероятно, на фоне хронического деструктивного воспалительного процесса пролиферация отдельных клонов лимфоцитов частично компенсирует глубокий комбинированный иммунодефицит, характерный для ФКТБ, и поддерживает функционирование иммунной системы в целом во избежание гибели организма. Активацию апоптоза на фоне угнетения пролиферативной активности клеток у больных ТБ с МЛУ можно связать со способностью лекарственно-устойчивых штаммов МБТ стимулировать апоптоз иммунокомпетентных клеток, а также с активацией и индукцией Treg. Немаловажным является то обстоятельство, что иммуносупрессорные эффекты Treg и лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* являются однонаправленными в аспекте активации апоптоза и угнетения пролиферации лимфоцитов.

Особенности цитокиновой регуляции иммунного ответа и роль функционального полиморфизма генов цитокинов в развитии ее нарушений у больных туберкулезом легких

Цитокиновая регуляция иммунного ответа при туберкулезе легких является сложным многокомпонентным процессом, обеспечивающим поддержание баланса между стимуляторами и ингибиторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Функциональная активность исследованных нами различных субпопуляций регуляторных Т-клеток во многом связана с продукцией ими достаточно разнообразного спектра иммуноактивных медиаторов, в том числе с ингибирующей активностью. В то же время иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-клеток обусловлены не только секрецией ими цитокинов, но и воздействием на них местного цитокинового микроокружения [Симбирцев А.С., 2011; Козлов В.А. и соавт., 2009].

Оценивая секрецию цитокинов, ассоциированных с Th1-лимфоцитами (IFN γ и IL-2), мы установили, что до назначения противотуберкулезных химиопрепаратов в разгар клинической картины заболевания у пациентов с ТБ независимо от его клинической формы уровень базальной секреции IFN γ значительно превышал контрольные значения. При этом у больных ФКТБ он был несколько ниже, чем в случае ДТБ и ИТБ. Анализ VCG-индуцированной секреции IFN γ у больных ТБ также показал ее выраженное увеличение вне связи с клинической формой заболевания. Интересно, что во всех обследованных группах пациентов с ТБ уровень базальной и VCG-индуцированной секреции IFN γ был достоверно выше у больных с лекарственно-чувствительными вариантами заболевания в сравнении с МЛУ ТБ. Схожая картина наблюдалась и у больных ТБ с положительной реакцией Манту (в данном случае уровень базальной и VCG-индуцированной секреции IFN γ превышал аналогичные значения у больных ТБ с отрицательной реакцией Манту).

Отметим, что в последнее время появились сведения о способности IFN γ , наряду с IL-2, выполнять функции контроля за гиперактивацией клеточного иммунитета с участием регуляторных Т-лимфоцитов. IFN γ может синтезироваться Treg при их активации и подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы IFN γ 1-го и 2-го типов [Sakaguchi S., 2011; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Wood K., Sawitzki B., 2006]. Таким образом, можно полагать, что высокая концентрация IFN γ в супернатантах культуральных суспензий мононуклеаров периферической крови (МПК) у обследованных нами больных ТБ могла поддерживаться за счет секреторных способностей отдельных субпопуляций Treg-лимфоцитов.

При исследовании секреции IL-2 МПК *in vitro* у больных ТБ было установлено снижение ее базального уровня при ФКТБ, в то время как угнетение VCG-индуцированной секреции IL-2 отмечалось при всех клинических формах ТБ, а также вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП и реакции Манту (коррелирующее с относительной лимфоцитопенией при ИТБ и ДТБ; $r = 0,70$, $p < 0,05$). Анализ IL-2-секреторной активности МПК *in vitro* у больных ТБ с различной чувствительностью возбудителя к ПТП (ЛЧ ТБ и МЛУ ТБ) показал, что в группе больных с диссеминированным и фиброзно-кавернозным МЛУ ТБ дефицит образования IL-2 был более выраженным, чем при аналогичных

клинических формах ЛЧ ТБ. При этом более значимый дефицит базальной секреции IL-2 отмечался у туберкулиноотрицательных больных ФКТБ.

Уникальная роль IL-2 в регуляции иммунитета связана не только с выполнением им функций ростового фактора, но и с контролем за гиперактивацией иммунной системы посредством стимуляции пролиферации и дифференцировки Treg-лимфоцитов [Козлов В.А. и соавт., 2009; Malek T., Bayer A., 2004]. Показано, что нейтрализация IL-2 антителами или его генетически обусловленный дефицит приводят к снижению содержания CD4⁺CD25^{hi} регуляторных Т-клеток в крови [Setoguchi R. et al., 2005]. Однако сведения литературы относительно действия IL-2 на дифференцировку и пролиферацию Treg-клеток противоречивы и неоднозначны. По данным А.М. Thornton, Е.М. Shevach (2000), высокие дозы IL-2, усиливая пролиферацию самих Treg-клеток, подавляют их супрессорную активность, но после завершения экспансии медиатора супрессорная активность Treg-клеток оказывается выше в разы, чем до действия IL-2 [Thornton A.M., 2006; Thornton A.M., Shevach E.M., 2000]. Вместе с тем имеются сведения иного характера: IL-2, действуя на активированные Treg, не влияет на их пролиферацию, повышая при этом выживаемость и объем популяции Treg-клеток [Bensinger S.J., et al., 2004]. Вероятно, указанные разногласия обусловлены особенностями действия IL-2 на разные этапы дифференцировки, пролиферации и активации Treg-клеток, а также эффектами различных доз цитокина, что объясняет установленное нами увеличение содержания иммуносупрессорных (Foxp3⁺) Treg-лимфоцитов в крови на фоне снижения секреции IL-2 *in vitro*.

Исследование содержания в супернатантах культуральных суспензий МПК цитокинов, ассоциированных с Treg- и Th2-лимфоцитами (IL-4, IL-10 и TGFβ), обладающих противовоспалительной и иммуносупрессорной активностью, позволило установить, что повышенный уровень базальной и VCG-индуцированной секреции IL-4 регистрировался у больных ДТБ (табл. 7), в том числе при МЛУ-варианте ДТБ и у пациентов с ДТБ независимо от реакции на внутрикожное введение туберкулина. У пациентов с ФКТБ, напротив, отмечалось снижение базальной и (как и при ИТБ) VCG-индуцированной секреции IL-4 (табл. 7). На наш взгляд, это связано с тем, что при ДТБ реализуется преимущественно специфический Th2-иммунный ответ с активацией В-лимфоцитов и их дифференцировкой в плазматические клетки-эффекторы гуморального иммунного ответа [Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009; Перельман М.И., 2007].

Как было отмечено выше, Treg обладают способностью ингибировать функции других клеток иммунной системы при непосредственном контакте или опосредованно через секрецию иммуносупрессорных цитокинов: IL-10 и TGFβ [Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Nishikawa H. et al., 2005; Sakaguchi S. 2004]. В настоящее время установлено, что IL-10 подавляет продукцию не только провоспалительных цитокинов, но и цитокинов, ассоциированных с Th2- и Th17-лимфоцитами. Кроме того, показана важная роль IL-10 в ограничении развития реакций врожденного и приобретенного противоинфекционного иммунитета, способных вызывать повреждение тканей организма [Симбирцев А.С., 2011; Ярилин А.А., 2010]. В связи с этим, IL-10 представляется «идеальным» цитокином-супрессором иммунного ответа.

Секреция цитокинов с иммуносупрессорной активностью IL-4, IL-10 и TGF- β *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания, Ме (Q₁–Q₃)

Группы обследованных лиц	IL-4 (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)		TGF- β (пг/мл)	
	Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG
Здоровые доноры	39,98 (21,140–55,04)	43,69 (26,46–68,55)	25,29 (13,50–33,56)	26,21 (22,74–60,22)	1108,75 (929,80–1487,20)	1087,80 (500,00–1412,60)
Больные ИТБ	35,45 (16,26–52,27)	26,53 (19,53–42,67) $p_1=0,039$ $p_4=0,047$	52,29 (27,73–61,06) $p_1=0,017$	59,27 (42,63–65,18) $p_1=0,004$	812,83 (471,52–1079,10) $p_1=0,004$	955,30 (317,46–1147,26)
Больные ДТБ	54,82 (39,71–78,20) $p_1=0,042$ $p_2=0,010$	59,72 (44,12–89,88) $p_1=0,012$ $p_2=0,001$	19,20 (11,43–32,17) $p_1=0,042$ $p_2=0,012$	26,63 (21,57–44,23) $p_2=0,003$	1227,72 (751,30–1676,20) $p_1=0,018$	712,70 (642,50–789,56) $p_1=0,037$ $p_4=0,017$
Больные ФКТБ	24,28 (14,62–53,17) $p_1=0,032$ $p_2=0,048$ $p_3=0,027$	36,29 (29,45–48,62) $p_1=0,043$ $p_2=0,042$ $p_3=0,029$ $p_4=0,036$	21,30 (14,37–35,27) $p_3=0,018$	16,55 (10,20–25,60) $p_1=0,050$ $p_2=0,012$ $p_3=0,050$	1742,58 (934,55–2517,13) $p_1=0,010$ $p_2=0,008$ $p_3=0,018$	1431,62 (754,72–2461,17) $p_1=0,046$ $p_2=0,049$ $p_3=0,027$ $p_4=0,047$

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 базальной секрецией.

В ходе проведённых исследований нами было зарегистрировано повышение уровня базальной и BCG-индуцированной секреции IL-10 *in vitro* у больных ИТБ в целом по группе (табл. 7) и вне зависимости от реакции на туберкулин, а также при лекарственно-чувствительном варианте заболевания. Снижение секреции IL-10 *in vitro* было отмечено только в группах пациентов с ДТБ (табл. 8) и лекарственно-чувствительным ФКТБ (при МЛУ ФКТБ она была, напротив, повышенной). Уровень базальной секреции IL-10 у больных ФКТБ с отрицательной реакцией Манту был сопоставимым с аналогичным показателем у здоровых доноров, в то время как уровень BCG-индуцированной секреции значительно снижался, что, по всей вероятности, свидетельствует о снижении функциональных резервных возможностей CD4-позитивных лимфоцитов, в числе которых могут быть и Трег-клетки.

Что касается TGF- β , то уровень базальной и BCG-индуцированной продукции данного медиатора у больных ИТБ как в целом по группе (табл. 7), так и при

МЛУ-варианте ИТБ был ниже, чем у здоровых доноров и больных фиброзно-кавернозным и (при МЛУ *M. tuberculosis*) диссеминированным ТБ. В последних случаях, напротив, отмечалось повышение продукции медиатора, при этом у больных ФКТБ регистрировались наиболее высокие ее значения, что является неблагоприятным фактором, поскольку известно, что гиперпродукция TGF- β способствует хронизации воспалительного процесса, формированию фиброза и деструктивных изменений в легочной ткани [Fichtner-Feigl S. et al., 2006].

Отметим, что 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 [Maizels R.M., Smith K.A., 2011; Miyara M., Sakaguchi S., 2011; Pop S.M. et al., 2005], что отчасти подтверждается положительной корреляцией между уровнем продукции TGF- β и количеством в крови регуляторных Т-клеток с иммунофенотипами CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ($r = 0,90$, $p < 0,01$), CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ($r = 0,53$, $p < 0,05$) и CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} ($r = 0,58$, $p < 0,05$), а также уровнем продукции IL-10 и количеством регуляторных Т-клеток с иммунофенотипом CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ($r = 0,49$, $p < 0,05$).

Для решения вопроса о наличии или отсутствии при ТБ генетически детерминированного дисбаланса базальной и BCG-индуцированной продукции *in vitro* цитокинов, контролирующей реакции противотуберкулезного иммунитета и ассоциированных с развитием и функциональной активностью регуляторных Т-клеток, актуальным было изучение аллельного полиморфизма генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IFNG*, *TGFB*.

В ходе проведенных исследований показано, что у больных ТБ распределение аллелей и генотипов исследуемых полиморфных сайтов генов цитокинов значительно отличается от такового в группе здоровых индивидов (табл. 8).

Так, было установлено изменение частот аллельных вариантов *T-330G* гена *IL2* среди больных ТБ, заключающееся в преобладании у них гетерозиготного варианта *TG* над гомозиготными генотипами. У больных ТБ значительно чаще регистрировался генотип *GG* и значительно реже – генотип *TT* гена *IL2*, чем в группе контроля (табл. 8). При этом у больных ДТБ генотип *GG* встречался в 2 раза чаще, а генотип *TT* в 2 раза реже, нежели у больных ИТБ.

Наряду с этим, среди больных ТБ чаще встречались гомозиготы по аллелю *A* (+874A/T) гена *IFNG*. Наиболее редким оказался гомозиготный генотип по аллелю *T* (табл. 8). В обеих группах больных ТБ (как и среди здоровых доноров) преобладали индивиды с гетерозиготным генотипом *AT* полиморфизма +874A/T гена *IFNG*. Значимых различий в распределении частот генотипов или аллелей между группами больных ИТБ и ДТБ выявлено не было. Кроме того, была показана положительная ассоциация генотипа *AA* (+874A/T) гена *IFNG* с ТБ (свидетельствующая о предрасполагающем его влиянии к развитию заболевания) и протективный по отношению к ТБ эффект аллеля *T* и генотипа *TT*.

В случае полиморфизма *C-590T* гена *IL4* было обнаружено, что наиболее редким генотипом у здоровых доноров и больных ТБ является гомозиготный вариант *TT* (табл. 8). Однако у больных ТБ аллель *T* и генотип *TT* встречались значительно чаще, чем в группе контроля, а при ДТБ – чаще, чем у больных ИТБ. Кроме того, среди больных ИТБ преобладали гомозиготы по аллелю *C*, а среди пациентов с ДТБ – гетерозиготы *CT* (*C-590T*) гена *IL4*.

**Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов генов цитокинов (% , абс.)
среди здоровых доноров и больных туберкулезом легких**

Поли- морфизм	Генотипы и аллели	Характеристика обследован- ных лиц		χ^2	OR (95 % CI)
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких		
1	2	3	4	5	6
<i>T-330G</i> гена <i>IL2</i>	<i>TT</i>	46,08 (47)	21,25 (34)	21,98 ($p_1 < 0,05$)	0,32 (0,18–0,54)
	<i>TG</i>	46,08 (47)	55,63 (89)		1,47 (0,89–2,42)
	<i>GG</i>	7,84 (8)	23,12 (37)		3,53 (1,57–7,95)
	<i>G</i>	30,88 (63)	50,94 (163)	19,62 ($p_1 < 0,05$)	2,32 (1,61–3,36)
+874 <i>A/T</i> гена <i>IFNG</i>	<i>AA</i>	17,65 (18)	36,25 (58)	12,80 ($p_1 < 0,05$)	2,64 (1,45–4,85)
	<i>AT</i>	53,92 (55)	48,13 (77)		0,79 (0,48–1,30)
	<i>TT</i>	28,43 (29)	15,62 (25)		0,47 (0,25–0,85)
	<i>T</i>	55,43 (113)	39,61 (127)	12,38 ($p_1 < 0,05$)	0,53 (0,37–0,76)
<i>C-590T</i> гена <i>IL4</i>	<i>CC</i>	69,61 (71)	48,75 (78)	9,39 ($p_1 < 0,05$)	0,42 (0,25–0,70)
	<i>CT</i>	26,47 (27)	45 (72)		2,33 (1,33–3,90)
	<i>TT</i>	3,92 (4)	6,25 (10)		1,63 (0,50–5,35)
	<i>T</i>	17,16 (35)	28,75 (92)	9,12 ($p_1 < 0,05$)	1,95 (1,26–3,02)
<i>C-592A</i> гена <i>IL10</i>	<i>CC</i>	48,04 (49)	30,62 (49)	9,46 ($p_1 < 0,05$)	0,48 (0,29–0,80)
	<i>CA</i>	44,12 (45)	53,13 (85)		1,44 (0,87–2,36)
	<i>AA</i>	7,84 (8)	16,25 (26)		2,28 (1,01–5,26)
	<i>A</i>	29,91 (61)	42,82 (137)	8,83 ($p_1 < 0,05$)	1,75 (1,21–2,55)
<i>C-509T</i> гена <i>TGFβ</i>	<i>CC</i>	43,14 (44)	21,87 (35)	14,38 ($p_1 < 0,05$)	0,37 (0,21–0,63)
	<i>CT</i>	42,16 (43)	51,88 (83)		1,48 (0,90–2,44)
	<i>TT</i>	14,70 (15)	26,25 (42)		2,06 (1,08–3,96)
	<i>T</i>	35,81 (73)	52,22 (167)	13,50 ($p_1 < 0,05$)	1,96 (1,37–2,81)

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров; χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95 % доверительным интервалом.

Также в ходе иммуногенетического анализа полиморфизма *C-592A* гена *IL10* удалось выявить, что среди больных ТБ преобладают гетерозиготы *CA* (табл. 8). При этом обращало на себя внимание увеличение частоты встречаемости аллеля *A* и гомозиготного генотипа *AA* в сочетании со снижением частоты обнаружения гомозиготного генотипа *CC* у больных ТБ как в целом по группе, так и при ИТБ. В то же время у больных ДТБ достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов промоторного сайта *C-592A* гена *IL10* ни по сравнению со здоровыми донорами, ни по сравнению с больными ИТБ не было установлено.

Анализ распределения частот генотипов полиморфизма *C-509T* гена *TGF β* показал, что среди больных ТБ преобладают гетерозиготы *CT* (табл. 8). Выявлена

положительная ассоциация аллеля *T*, а также генотипа *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* с ТБ как в группе больных ИТБ, так и ДТБ. Отмечено, что генотип *CC* (*C-509T*) гена *TGFB* обладает протективным эффектом в отношении подверженности ТБ.

В ходе изучения взаимосвязи ТБ с аллельным полиморфизмом генов цитокинов обнаружено также, что наибольший риск развития заболевания связан с носительством гомозиготных генотипов *GG* (*T-330G*) гена *IL2* и *AA* (*+874A/T*) гена *IFNG* (OR = 7,97) (рис. 1). В свою очередь наиболее значимый протективный эффект в отношении ТБ опосредован сочетанием генотипов *TT* (*T-330G*) гена *IL2* и *CC* (*C-592A*) гена *IL10* (OR = 0,14) (рис. 1).

При изучении зависимости между содержанием ИЛ-2 в супернатантах МПК и вариантом полиморфного сайта *T-330G* соответствующего гена выявлено, что у индивидов с генотипом *GG* базальный и ВСГ-индуцированный уровень продукции ИЛ-2 *in vitro* был значимо ниже, чем у здоровых доноров с генотипами *TT* и *TG*. Наиболее низкий уровень продукции ИФН γ оказался свойственным носителям гомозиготного генотипа *AA*. Поскольку носительство «низкопродуцирующего» генотипа *AA* (*+874A/T*) гена *IFNG* у больных ТБ сочеталось с гиперпродукцией ИФН γ *in vitro* можно полагать, что такого рода изменения не связаны с исследованным полиморфизмом гена цитокина. По-видимому, они являются результатом высокой иммуногенности *M. tuberculosis* и их активирующим воздействием на клетки-продуценты ИФН γ , в числе которых, как указывалось выше, могут быть и различные субпопуляции регуляторных Т-клеток.

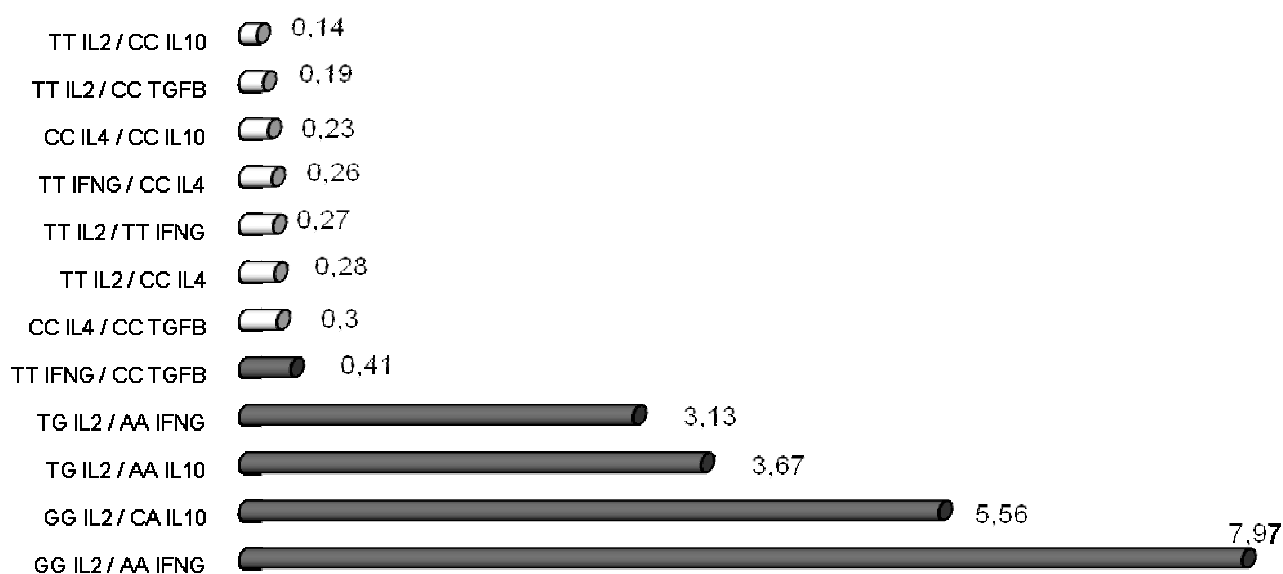


Рис. 1. Риск развития туберкулеза легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов генов цитокинов. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов, справа – критерий отношения шансов (OR)

Анализ уровня продукции ИЛ-4 в зависимости от аллельного варианта полиморфизма *C-590T* гена *IL4* показал, что у гомозигот по аллелю *T* уровень секреции ИЛ-4 является максимальным, а у гомозигот по аллелю *C* – минимальным как у здоровых доноров, так и у больных ТБ. Базальная и ВСГ-индуцированная секреция ИЛ-4 *in vitro* у больных ИТБ и ДТБ с генотипом *TT* была значимо выше, чем в случае носительства генотипов *CT* и *CC* полиморфного сайта *C-590T* гена *IL4*. В случае

секреции IL-10 в зависимости от генотипов по полиморфизму C-592A гена *IL10* у здоровых доноров и больных ТБ имелись различия. Так, у здоровых доноров с генотипом AA содержание IL-10 в супернатантах было значимо выше, чем у лиц с генотипами CC и CA, в то время как у больных ИТБ и ДТБ, несущих генотипы CA и AA гена *IL10*, спонтанная и VCG-индуцированная продукция исследуемого цитокина была выше, чем при носительстве генотипа CC. При этом у больных ТБ генотипы TT (при ИТБ и ДТБ) и CT (при ДТБ) гена *IL4* и генотипы AA и CA гена *IL10* (при ИТБ и ДТБ) оказались ассоциированными с более высокой продукцией соответствующих цитокинов *in vitro* в сравнении с группой здоровых доноров.

Анализ секреции TGF- β *in vitro* у больных ТБ в зависимости от аллельного варианта полиморфизма C-509T гена *TGFB* показал, что у гомозигот по аллелю T (преобладающих среди пациентов с ДТБ) она является максимальной (при ИТБ и ДТБ в случае индукции МПК VCG – выше, чем у здоровых доноров), а у гомозигот по аллелю C – минимальной. В подгруппе больных ИТБ повышение спонтанной продукции исследуемого цитокина по сравнению с нормой было зарегистрировано только у лиц, несущих генотип CT, а у больных ДТБ – только у лиц с генотипом TT.

Таким образом, выявленная у больных ТБ гиперсекреция цитокинов с иммуносупрессорной активностью на фоне дисбаланса продукции провоспалительных цитокинов является генетически детерминированной и способствует формированию супрессорного режима иммунорегуляции при туберкулезной инфекции.

РЕЗЮМЕ

В ходе настоящей работы было проведено многоуровневое изучение роли регуляторных Т-клеток в механизмах супрессии иммунного ответа, реализующегося при проникновении *Mycobacterium tuberculosis* в организм человека, с привлечением широкого комплекса современных иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования. Полученные данные в определенной степени представляются неоднозначными. Однако бесспорным является тот факт, что регуляторные Т-клетки играют важную роль в иммунопатогенезе туберкулеза легких. На рис. 2 представлена общая схема, демонстрирующая взаимосвязь факторов, лежащих в основе иммуносупрессии при туберкулезной инфекции.

При анализе субпопуляционного состава и функциональной активности регуляторных Т-клеток у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам и характера реакции Манту установлено, что их супрессорные эффекты являются однонаправленными. При этом наиболее выраженная супрессия иммунного ответа отмечается у туберкулиннегативных больных с диссеминированным множественно лекарственно-устойчивым и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких. Особенно следует отметить роль естественных регуляторных $\gamma\delta$ Т-клеток в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции. $\gamma\delta$ Т-клетки являются представителями «первой линии защиты» от патогенов и занимают промежуточное положение на границе врожденного/адаптивного иммунитета.

Абсолютно доказанным на сегодня является тот факт, что эффективная реализация антигенспецифического адаптивного иммунитета невозможна без

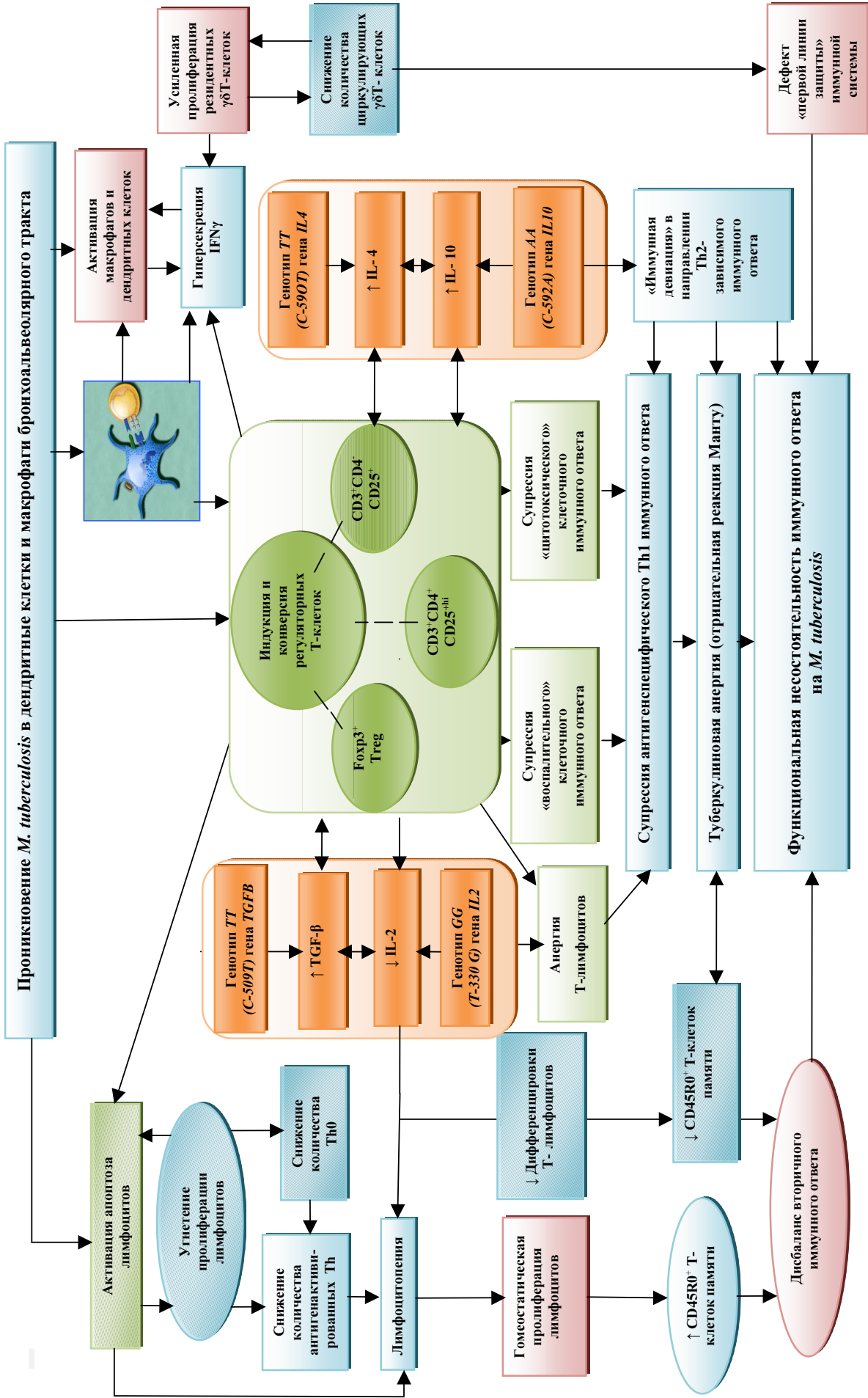


Рис. 2. Патогенез супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких.
 На схеме: ■ — по данным Р.М. Хайтова и соавт. [2011]; ■; ■; ■ — по результатам собственных исследований

предварительной активации врожденного иммунитета. Подтверждение этому – Нобелевская премия мира 2011 года в номинации «Физиология и медицина», присужденная В.А. Beutler, J.A. Hoffmann и R.M. Steinman – ученым-иммунологам, в течение трех последних десятилетий активно изучавшим взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета [www.nobelprize.org]. Сегодня $\gamma\delta$ T-клетки, наряду с дендритными клетками и макрофагами, считаются ключевыми антигенпрезентирующими и регуляторными клетками в процессе иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*.

Установленные в настоящей диссертационной работе факты позволяют сделать заключение, что у больных туберкулезом легких снижение количества циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток свидетельствует о неэффективном «иммунологическом надзоре» на уровне врожденного иммунитета, увеличение количества регуляторных T-клеток и их функциональной активности способствует угнетению адаптивного антигенспецифического ответа, дисбаланс количества T-клеток памяти свидетельствует о дисрегуляции вторичного иммунного ответа и, наконец, генетически запрограммированная гиперсекреция цитокинов-ингибиторов в сочетании с гипосекрецией T-клеточного ростового фактора являются важнейшими этиопатогенетическими факторами вторичной иммунологической недостаточности, сопровождающей течение туберкулезной инфекции. Указанные изменения взаимосвязаны, влияют друг на друга с формированием своеобразных «порочных кругов» в иммунопатогенезе туберкулеза легких (рис. 2).

Мы отчетливо представляем, что в настоящей работе освещена лишь часть вопросов, касающихся супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких, и исследования в данном направлении должны быть продолжены. В указанном аспекте наиболее актуальным представляется исследование роли альвеолярных дендритных и $\gamma\delta$ T-клеток в иммунопатогенезе туберкулеза с применением иммуногистохимических методов, а также дальнейшее изучение молекулярно-генетических особенностей функционирования иммунной системы при туберкулезной инфекции.

ВЫВОДЫ

1. Прогрессирующее течение распространенного деструктивного туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) *Mycobacterium tuberculosis* ассоциировано с увеличением содержания и функциональной активности регуляторных T-клеток, изменения субпопуляционного состава которых связаны с клинической формой заболевания, характером реакции Манту и чувствительностью *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам.

2. Отрицательная реакция Манту (туберкулиновая анергия), характеризующая неэффективность (супрессию) антигенспецифического иммунного ответа, у больных диссеминированным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких сопряжена с МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам.

3. Изменения субпопуляционного состава CD4-позитивных регуляторных T-лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких проявляются увеличением количества клеток с иммунофенотипами $CD3^+CD4^+CD25^{+hi}$,

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и (при фиброзно-кавернозной форме) CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ в условиях дефицита CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Т-клеток. У больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) *Mycobacterium tuberculosis* и отрицательной реакцией Манту указанные изменения более выражены, чем у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких и положительной реакцией Манту.

4. Увеличение числа CD4-негативных регуляторных Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD25⁺ в крови у больных туберкулезом легких характеризуется наибольшей выраженностью при диссеминированной форме заболевания с отрицательной реакцией Манту и МЛУ *Mycobacterium tuberculosis*.

5. О дисрегуляции вторичного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* при туберкулезе легких свидетельствуют разнонаправленные изменения количества Т-лимфоцитов памяти, связанные с увеличением числа CD45R0⁺ клеток при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких и МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* (при инфильтративной и фиброзно-кавернозной формах заболевания) и, напротив, его снижением при туберкулиновой анергии, особенно выраженным у туберкулин-отрицательных больных с диссеминированным туберкулезом легких.

6. Дефицит количества циркулирующих $\gamma\delta$ Т-клеток, наиболее выраженный у больных инфильтративным и фиброзно-кавернозным туберкулезом легких с отрицательной реакцией Манту, способствует ослаблению первичного протективного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*, что на фоне дисрегуляции вторичного иммунного ответа свидетельствует о наличии у больных туберкулезом легких функциональной многокомпонентной недостаточности иммунной системы.

7. В основе иммуносупрессии при МЛУ и лекарственно-чувствительном туберкулезе легких лежат сходные (но более значимые в случае МЛУ *Mycobacterium tuberculosis*) нарушения, связанные с увеличением количества Foxp3-экспрессирующих Treg-лимфоцитов и CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}, CD3⁺CD4⁻CD25⁺ регуляторных Т-клеток в крови, дисбалансом пролиферации и апоптоза лимфоцитов, дефицитом IL-2 и гиперпродукцией IL-4, IL-10 и TGF- β *in vitro*.

8. Иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-клеток при туберкулезе легких с лекарственной чувствительностью и МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* сопряжены с гиперсекрецией противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- β), активацией апоптоза и подавлением спонтанного и PPD-индуцированного пролиферативного ответа лимфоцитов, опосредующих абсолютную и относительную лимфоцитопению, в том числе (при диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких) снижение общего количества CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов в периферической крови.

9. Цитокинопосредованная супрессия Th1-зависимого иммунного 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 гиперергическую реакцию Treg-клеток на *Mycobacterium tuberculosis*.

10. Риск развития туберкулеза легких ассоциирован с генотипами GG (T-330G) гена IL2, CT и TT (C-590T) гена IL4, AA (C-592A) гена IL10, TT (C-509T) гена TGF β и AA (+874A/T) гена IFNG. При этом частота встречаемости аллеля G и

генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-590T*) гена *IL4*, аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* значимо выше при диссеминированном, чем при инфильтративном туберкулезе легких.

11. Гипопродукция *IL-2* и увеличение секреции цитокинов с иммуносупрессорной активностью *IL-4*, *IL-10*, *TGF-β* *in vitro* у впервые выявленных больных туберкулезом легких ассоциированы с носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, 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*.

12. Согласно построенной прогностической модели с использованием дискриминантного анализа, наиболее информативным для прогноза МЛУ *Mycobacterium tuberculosis* у впервые выявленных больных туберкулезом легких является определение комплекса иммунологических показателей, характеризующих содержание $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{+hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов в крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССРЕТАЦИИ

1. Особенности иммуносупрессии при вирусных инфекциях / *Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий* [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. 2009. № 4. С. 112–117.
2. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при туберкулезе легких / *И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, А.К. Стрелис, В.В. Новицкий, Е.Л. Никулина, Р.Р. Хасанова, Т.Е. Кононова, В.А. Серебрякова, О.А. Васильева, Н.А. Сухаленцева, Е.Г. Чурина* [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009. Т. 148. № 8. С. 137–142.
3. Молекулярно-генетические аспекты прогнозирования и иммунотерапии туберкулезной инфекции / *В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.О. Наследникова, А.К. Стрелис, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина* [и др.] // *Успехи физиологических наук*. 2009. Т. 40. № 2. С. 40–46.
4. Полиморфизм генов *IL-2* и *IL-4* при инфильтративном туберкулезе легких / *И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.В. Воронкова, А.И. Рубанова, Ю.В. Стамбула, Р.Р. Хасанова, Т.Е. Будкина, О.В. Колоколова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина* [и др.] // *Иммунология*. 2009. Т. 30. № 2. С. 88–92.
5. Модулирующее влияние изониазида и рифампицина на секрецию цитокинов *in vitro* при туберкулезе легких / *В.А. Серебрякова, О.А. Васильева, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, А.К. Стрелис, Т.Е. Будкина, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, Е.Г. Чурина* [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. 2009. № 7. С. 58–64.
6. 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. Khasanova, T.E. Kononova, V.A. Serebryakova, O.A. Vasilyeva, N.A. Sukhalentseva, E.G. Churina* [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. Vol. 148. No. 2. August, 2009. P. 175–180.

7. TGF- β как фактор иммуносупрессии у туберкулинотрицательных пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова [и др.] // Инновации в медицине. Социально значимые инфекционные заболевания: Материалы VIII российско-германской научно-практической конференции / под ред. В.В. Степанова, Г. Хана. Новосибирск: ООО «Альфа Виста», 2009. С. 198–199.
8. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / Е.Л. Никулина, К.О. Михеева, Н.А. Сухаленцева, И.О. Наследникова, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, Е.Г. Чурина [и др.] // Актуальные проблемы патофизиологии: XV межгородская конференция молодых ученых. СПб., 2009. С. 85–86.
9. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у больных инфильтративным туберкулезом легких в зависимости от выраженности туберкулиновой реакции / 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.: СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2009. С. 47.
10. Аллельный полиморфизм генов IFN γ и TGF β при туберкулезе легких / Е.Л. Никулина, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, О.В. Филинчук, Е.Г. Чурина [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.: СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2009. С. 48.
11. Модулирующий эффект офлоксацина на апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких / В.А. Серебрякова, Т.Е. Кононова, О.А. Васильева, А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина [и др.] // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XVI межгородской конференции молодых ученых. СПб., 2010. С. 156–158.
12. Особенности продукции провоспалительных цитокинов у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких / 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.
13. Особенности цитокинового профиля у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / 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.
14. Уровень секреции TGF- β *in vitro* и α 2-макроглобулина в сыворотке крови у больных деструктивными формами туберкулеза легких / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.А. Серебрякова // Вопросы патогенеза типовых патологических процессов: Труды II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Новосибирск, 2010. С.169–173.
15. Уровень сывороточного альфа-2-макроглобулина у больных туберкулезом легких с отрицательной реакцией Манту / Е.Г. Чурина, А.Е. Колосова, О.И. Уразова [и др.] // В мире научных открытий. 2010. № 4 (10). Ч. 14. С. 97–99

16. Функциональный полиморфизм гена IL-2 при туберкулезе легких / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Л. Никулина, Н.А. Сухаленцева, Ю.В. Колобовникова, О.В. Воронкова, В.А. Серебрякова, *Е.Г. Чурина* // Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении: Материалы IX российско-германской научно-практической конференции им Р. Коха и И.И. Мечникова. Новосибирск, 2010. С. 234–236.
17. Субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток у пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / *Е.Г. Чурина*, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Филинчук [и др.] // Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении: Материалы IX российско-германской научно-практической конференции им Р. Коха и И.И. Мечникова. Новосибирск, 2010. С. 257–258.
18. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / А.Е. Колосова, О.И. Уразова, *Е.Г. Чурина* [и др.] // Науки о человеке: Сборник статей по материалам XI конгресса молодых ученых и специалистов. Томск, 2010. С. 57–58.
19. Аллельный полиморфизм генов IFN γ и TGF β как фактор модуляции секреции цитокинов и подверженности туберкулезу легких / Е.Л. Никулина, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, *Е.Г. Чурина* [и др.] // **Туберкулез и болезни легких**. 2010. № 6. С. 15–19.
20. Особенности секреции про- и противовоспалительных цитокинов *in vitro* у туберкулиноотрицательных пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / *Е.Г. Чурина*, О.И. Уразова, В.В. Новицкий [и др.] // **Пульмонология**. 2010. № 5. С. 46–50.
21. Аллельный полиморфизм гена IFN γ при туберкулезе легких / Е.Л. Никулина, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, Е.В. Некрасов, О.В. Филинчук, *Е.Г. Чурина* [и др.] // **Медицинская иммунология**. 2010. Т.12. № 3. С. 259–264.
22. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинко-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, *Е.Г. Чурина* [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. 2010. № 3. С. 42–50.
23. Роль $\gamma\delta$ T- и NK-клеток в иммунном ответе / *Е.Г. Чурина*, О.И. Уразова, В.В. Новицкий [и др.] // **Бюллетень сибирской медицины**. 2010. № 5. С. 138–142.
24. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / *Е.Г. Чурина*, О.И. Уразова, О.В. Воронкова [и др.] // **Цитокины и воспаление**. 2010. Т. 9. № 3. С. 74.
25. Реактивность иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких: молекулярно-генетическое исследование / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, Е.Л. Никулина, *Е.Г. Чурина* [и др.] // **Вестник Уральской медицинской академической науки**. 2010. № 4. С. 104–107.
26. Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* – возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова

- ва, Р.Р. Хасанова, В.В. Новицкий, *Е.Г. Чурина* [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. 2011. № 1. С. 12–17.
27. Особенности продукции цитокинов и альфа2-макроглобулина у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких / А.Е. Колосова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, *Е.Г. Чурина* [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. 2011. № 1. С. 48–52.
 28. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции / *Е.Г. Чурина*, О.И. Уразова, О.В. Воронкова [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. 2011. № 3. С. 3–7.
 29. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях / *Е.Г. Чурина*, В.В. Новицкий, О.И. Уразова // *Бюллетень сибирской медицины*. 2011. № 4. С. 103–111.
 30. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / *Е.Г. Чурина*, В.В. Новицкий, О.И. Уразова [и др.] // *Бюллетень сибирской медицины*. 2011. № 4. С. 183–186.
 31. Особенности иммунорегуляции у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / *Е.Г. Чурина*, В.В. Новицкий, О.И. Уразова [и др.] // *Медицинская иммунология*. 2011. Т.13. № 2–3. С. 267–272.
 32. Эпидемиологические и иммунопатологические особенности Beijing-туберкулеза в Томской области / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, И.О. Наследникова, З.К. Хайтова, *Е.Г. Чурина* [и др.] // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011. № 3(58). С. 4–11.
 33. Цитокиновый статус у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, *Е.Г. Чурина* // *Российский иммунологический журнал*. 2011. Т.5 (14), № 3–4. С. 244–253.
 34. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / *Е.Г. Чурина*, В.В. Новицкий, О.И. Уразова [и др.] // *Медицинская иммунология*. 2012. Т.14. № 1–2. С. 119–126.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ


ДТБ – диссеминированный туберкулез легких
 ИТБ – инфильтративный туберкулез легких
 ЛЧ – лекарственная чувствительность
 МБТ – микобактерии туберкулеза
 МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
 МПК – мононуклеарные лейкоциты периферической крови
 ПТП – противотуберкулезные препараты
 ТБ – туберкулез легких
 ФКТБ – фиброзно-кавернозный туберкулез легких
 BCG (*Bacillus Calmette – Guérin*) – бацилла Кальмета – Герена
 PPD (*purified protein derivate*) – туберкулин
 Th – T-helper – субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов/индукторов
 Treg – регуляторные Т-клетки

Подписано к печати 25.01.2012. Формат 60×84/16. Бумага «Снегурочка».
Печать XEROX. Усл.печ.л. 2,56. Уч.-изд.л. 2,86.
Заказ 38-12. Тираж 120 экз.



Томский политехнический университет
Система менеджмента качества
Томского политехнического университета сертифицирована
NATIONAL QUALITY ASSURANCE по стандарту ISO 9001:2008



ИЗДАТЕЛЬСТВО  ТПУ. 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30
Тел./факс: 8(3822)56-35-35, www.tpu.ru