

УДК 615.37:616.24-002.5

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ
ЛЕГКИХ С ЭОЗИНОФИЛИЕЙ**Ю.В. Колобовникова¹, О.И. Уразова¹, В.В. Новицкий^{1,2},
Е.Г. Чурина¹¹ Сибирский государственный медицинский университет
(СибГМУ), г. Томск² Томский государственный университет

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик Российской академии наук, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ, стар. науч. сотр. лаборатории моделирования физических процессов в биологии и медицине физического факультета ТГУ.
E-mail: patfizssmu@yandex.ru

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ.
E-mail: urazova72@yandex.ru

Колобовникова Юлия Владимировна, д-р мед. наук, ассистент кафедры патофизиологии СибГМУ.
E-mail:

kolobovnikova.julia@mail.ru
Область научных интересов: изучение молекулярных основ нарушения гомеостаза клеток крови при социально значимых заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы с целью разработки новых технологических основ этиотропной и патогенетической терапии; исследование молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития заболеваний, сопровождающихся эозинофилией (гемобластозы, описторхоз, туберкулез легких); изучение структурных и функциональных особенностей эозинофильных гранулоцитов в норме и при патологии, установление роли эозинофилии в иммунопатогенезе актуальных заболеваний.

Чурина Елена Георгиевна, д-р мед. наук, доцент кафедры патофизиологии СибГМУ.
E-mail: lena1236@yandex.ru

Область научных интересов: иммунология, клиническая иммунология и аллергология, молекулярная биология.

Туберкулез легких, сопровождающийся эозинофилией, характеризуется дисбалансом иммунного ответа с превалированием гуморальных иммунных реакций. Целью исследования явилась оценка механизмов Treg-опосредованной супрессии иммунного ответа у больных туберкулезом легких с эозинофилией. Исследование выполнено на лимфоцитах, выделенных из периферической крови 64 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией и без нее. С применением методов проточной цитометрии и иммуноферментного анализа изучены содержание регуляторных T-клеток по экспрессии поверхностных молекул (CD4, CD25) и внутриклеточного маркера Foxp3, и секреция иммуносупрессорных цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro*. В результате исследования установлено, что у больных туберкулезом легких с эозинофилией возрастает количество регуляторных T-клеток в периферической крови. При этом установлен дисбаланс секреции *in vitro* Treg-ассоциированных цитокинов, характеризующийся гиперпродукцией TGF β и IL-10 (при индукции клеток BCG).

Ключевые слова:

Эозинофилия, регуляторные T-клетки, цитокины, туберкулез легких.

Одним из механизмов супрессии Th1-зависимого иммунного ответа при туберкулезе легких (ТЛ) является увеличение в периферической крови регуляторных T-клеток (Treg), реализующих свои функции путем контактного взаимодействия и за счет секреции цитокинов-ингибиторов (интерлейкин (IL) – 10 и трансформирующий фактор роста (TGF) β) [1–3]. В исследованиях, проведенных нами ранее, было показано, что у больных ТЛ увеличение численности Treg в периферической крови сопряжено с повышением количества эозинофильных гранулоцитов [4].

В связи с этим целью исследования явилось изучение факторов Treg-опосредованной супрессии иммунного ответа у больных туберкулезом легких с эозинофилией крови.

Под наблюдением находилось 64 пациента с впервые выявленным распространенным деструктивным ТЛ (инфильтративным – ИТЛ, диссеминированным – ДТЛ, лекарственно-чувствительным – ЛЧТЛ, лекарственно-устойчивым – ЛУТЛ) в возрасте от 18 до 55 лет.

В зависимости от абсолютного и относительного количества эозинофилов в периферической крови были сформированы две основные группы исследования: первую группу составили 35 пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (абсолютное количество эозинофилов соответствовало $(0,966 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$, относительное – $(8,790 \pm 0,250) \%$); во вторую группу вошли 29 больных ТЛ без эозинофилии (абсолютное число эозинофилов – $(0,249 \pm 0,010) \times 10^9/\text{л}$, относительное – $(2,572 \pm 1,190) \%$).

Группу сравнения (контроль) составили 32 здоровых донора (абсолютное число эозинофилов – $(0,196 \pm 0,010) \times 10^9/\text{л}$, относительное – $(3,530 \pm 1,300) \%$), сопоставимых по полу и возрасту.

При проведении иммуноферментного анализа у всех обследованных лиц диагностически значимых титров антител (иммуноглобулинов класса G) к антигенам гельминтов в сыворотке крови не обнаруживалось; отсутствие паразитоза подтверждалось копроовоскопически.

Все исследования у больных ТЛ проводили до начала специфической противотуберкулезной терапии.

Материалом исследования служила венозная кровь. Исследования проводили на мононуклеарных лейкоцитах, предварительно выделенных на прерывистом градиенте плотности фикола ($\rho = 1077 \text{ г/л}$) («БиолоТ», Россия). Определение содержания регуляторных Т-клеток по экспрессии поверхностных молекул CD4, CD25 и внутриклеточного маркера *Foxp3* в лимфоцитах периферической крови осуществляли методом проточной цитометрии («Becton Dickinson (BD)», США). Количественное определение цитокинов осуществляли в супернатантах культуральных суспензий с применением твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода (ELISA). Процедуру иммуноферментного анализа выполняли согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Biosource», США; «Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Для индукции цитокин-секреторной активности клеток в пробы вносили вакцинный штамм BCG в дозе 50 мкг/мл (ФГУП «НПО Микроген»). Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0.

Туберкулез легких (ТЛ) в сочетании с эозинофилией крови характеризуется снижением концентрации ключевых цитокинов противотуберкулезного иммунитета в сочетании с повышением содержания В-лимфоцитов в периферической крови [5]. Выявленные изменения указывают на превалирование специфического Th2-зависимого иммунного ответа, выполняющего скорее вспомогательную роль в механизмах защиты макроорганизма от *M. tuberculosis*. По мнению исследователей, снижение интенсивности протективного иммунного ответа при ТЛ может быть обусловлено избыточной активностью регуляторных Т-клеток [2, 3, 6].

В настоящем исследовании мы оценили содержание регуляторных Т-клеток (Treg), экспрессирующих внутриклеточный транскрипционный фактор *Foxp3*, у больных ТЛ в зависимости от числа эозинофилов в периферической крови. В результате исследования установлено достоверное повышение количества $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Treg у всех пациентов с ТЛ, тогда как содержание CD25-негативных Treg-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточный маркер *Foxp3*, возрастало только у больных с лекарственно-устойчивым вариантом ДТЛ без эозинофилии. Обращало на себя внимание достоверное увеличение численности Т-лимфоцитов с фенотипом $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (6,28 (4,02–9,00) % у больных ИТЛ и 6,72 (3,92–11,56) % у больных ДТЛ), при этом более выраженные изменения количества Treg были обнаружены при лекарственно-устойчивом варианте заболевания (7,04 (6,78–11,48) %, $p_4 < 0,05$).

Известно, что реализация супрессорного потенциала Treg может происходить путем конкурентного CTLA4/B7 взаимодействия или за счет секреции IL-10 и TGF β [7, 8].

В ходе исследования в условиях *in vitro* нами было зарегистрировано увеличение уровня спонтанной и BCG-индуцированной секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при лекарственно-чувствительном варианте ИТЛ без эозинофилии (табл. 1).

Таблица 1. Содержание IL-10 и TGFβ в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких, Me (Q₁–Q₃)

Группы исследования		IL-10		TGFβ		
Здоровые доноры		Базальная	25,29 (13,50–33,56)	1108,75 (929,80–1487,20)		
		BCG-индуцированная	26,21 (22,74–60,22)	1087,80 (500,00–1412,60)		
Больные туберкулезом легких		Лекарственно-чувствительный		Лекарственно-устойчивый	Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
С эозинофилией	Инфильтративный	Базальная	20,91 (14,07–29,24)	22,56 (13,70–29,89)	1299,03 (840,59–1327,78) p ₁ < 0,05	1001,60 (630,74–1103,00) p ₄ < 0,05
		BCG-индуцированная	43,17 (32,73–61,28) p ₁ < 0,05 p ₅ < 0,05	42,98 (31,63–63,15) p ₁ < 0,05	627,50 (553,50–731,71) p ₁ < 0,05 p ₅ < 0,05	652,10 (545,91–743,06) p ₁ < 0,05 p ₅ < 0,05
	Диссеминированный	Базальная	19,00 (16,740–24,71)	20,37 (17,29–25,12)	1421,31 (769,45–2140,73) p ₁ < 0,05 p ₃ < 0,05	1632,12 (774,90–2005,78) p ₁ < 0,05 p ₃ < 0,05 p ₄ < 0,05
		BCG-индуцированная	46,81 (23,90–70,52) p ₁ < 0,05 p ₅ < 0,05	44,93 (25,18–69,30) p ₁ < 0,05	1267,83 (771,45–1663,00) p ₁ < 0,05 p ₅ < 0,05	1365,48 (829,40–1748,22) p ₁ < 0,05 p ₃ < 0,05 p ₅ < 0,05
Без эозинофилии	Инфильтративный	Базальная	44,92 (18,75–57,64) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05	27,51 (24,18–42,71) p ₄ < 0,05	1062,91 (792,24–1613,57) p ₂ < 0,05	578,02 (315,29–781,46) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₄ < 0,05
		BCG-индуцированная	55,49 (32,22–65,28) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₅ < 0,05	24,51 (25,62–53,21) p ₂ < 0,05 p ₄ < 0,05	1125,92 (875,16–1215,07) p ₂ < 0,05	752,17 (495,32–991,45) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₅ < 0,05
	Диссеминированный	Базальная	24,11 (9,54–50,72) p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	20,07 (18,22–21,13)	923,62 (728,24–1427,19) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	1072,33 (915,61–2452,27) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05
		BCG-индуцированная	33,52 (20,64–66,17) p ₃ < 0,05 p ₅ < 0,05	26,52 (23,57–35,24) p ₂ < 0,05	873,18 (571,11–1031,92) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	1986,58 (792,53–3009,68) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05 p ₄ < 0,05 p ₅ < 0,05

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p₂ – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p₃ – у больных инфильтративным туберкулезом легких; p₄ – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p₅ – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Установлена отрицательная корреляция между повышенной концентрацией IL-10 в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов и содержанием IL-5 в крови у пациентов данной группы ($r = -0,67$, $p < 0,05$) [9], что подтверждает супрессорные свойства цитокина, способного подавлять продукцию цитокинов Th2-лимфоцитами. У больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, независимо от формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП базальная секреция IL-10 соответствовала контрольным значениям, а уровень BCG-индуцированной секреции этого медиатора достоверно превышал таковой у здоровых лиц (табл. 1).

Следует отметить, что при ТЛ с эозинофилией нормальный уровень секреции IL-10 *in vitro* сочетался с высоким числом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в крови. Учитывая, что IL-10 – это не единственный антагонист цитокинов клеточного звена иммунитета и активатор супрессорных механизмов, установленное нами несоответствие можно объяснить включением в регуляцию Th1/Th2-баланса при туберкулезной инфекции с эозинофилией других цитокинов, в частности TGFβ, главным свойством которого является супрессия всех типов иммунного ответа [10, 11].

Согласно результатам, полученным в настоящем исследовании, уровень базальной продукции TGFβ в культуре мононуклеарных лейкоцитов у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно превышал контрольные значения и параметры спонтанной секреции медиатора при ТЛ без эозинофилии (табл. 1). Максимальный уровень базальной и индуцированной *in vitro* продукции TGFβ регистрировался при ЛУ ДТЛ с эозинофилией (1632,12 (774,90–2005,78) пг/мл, $p_4 < 0,05$). Профицит секреции TGFβ у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, по всей видимости, является проявлением гиперфункции основных клеток-продуцентов этого цитокина. Учитывая, что TGFβ является цитокином, опосредующим пролиферацию, дифференцировку Treg и одновременно реализацию ими иммуносупрессорных свойств, избыточные концентрации медиатора при ТЛ могут, с одной стороны, быть причиной увеличения численности субпопуляции Treg, а с другой – следствием избыточного содержания последних в крови. Вместе с тем эозинофильные гранулоциты сами являются источником TGFβ, особенно при заболеваниях, сопровождающихся эозинофилией [12, 13].

Таким образом, накопление Treg-лимфоцитов в сочетании с высоким уровнем TGFβ может быть механизмом иммуносупрессии при ТЛ (в частности, при ДТЛ), течение которого сопряжено с эозинофильной реакцией крови. В целом преобладание гуморального звена иммунного ответа в сочетании с активацией клеток-супрессоров при ТЛ с эозинофилией является неблагоприятным фактором, определяющим более тяжелое прогрессирующее течение заболевания.

Исследования проведены при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-4184.2014.7 «Молекулярные механизмы нарушения апоптоза, пролиферации, дифференцировки и коммуникации клеток крови при социально значимых заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы», руководитель – академик РАН В.В. Новицкий) и Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых – кандидатов медицинских наук (Договор № 14.124.13.3383-МК «Роль эозинофильной реакции крови в патогенезе инфекционного процесса», руководитель – Ю.В. Колобовникова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of *Foxp3*-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis // Hindawi Publishing Corporation, Tuberculosis Research and Treatment. – 2012. – V. 2012. – Article 931291, 9 pages, doi: 10.1155/2012/931291
2. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу у больных туберкулезом легких / Е.Р. Черных, А.А. Останин, В.С. Кожевников и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2002. – № 7. – С. 43–47.
3. Иммуносупрессорные эффекты Т-регуляторных клеток при инфильтративном туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 4. – С. 26–29.
4. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в механизмах модуляции иммунного ответа при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова и др. // Иммунология. – 2012. – № 4. – С. 184–188.
5. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 1. – С. 39–45.

6. CD25⁺ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection / D.C. Lee, J.A. Harker, J.S. Tregoning et al. // *J. Virol.* – 2010. – V. 84 (17). – P. 8790–8798.
7. Miyara M., Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression // *J. Trends. Mol. Med.* – 2007. – V. 13. – P. 108–116.
8. Miyara M., Sakaguchi S. Human FoxP3⁺CD4⁺ regulatory T cells: their knowns and unknowns // *J. Immunol. Cell Biol.* – 2011. – V. 89 (3). – P. 346–351.
9. Молекулярные механизмы формирования эозинофилии крови при туберкулезе легких / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // *Вестник РАМН.* – 2012. – № 5. – С. 58–62.
10. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // *Иммунология.* – 2006. – № 3. – С. 176–188.
11. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during autoimmune diabetes / S.M. Pop, C.P. Wong, D.A. Culton et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201 (8). – P. 1333–1346.
12. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially / L.A. Spencer, C.T. Szela, S.A. Perez et al. // *J. Leukoc Biol.* – 2009. – V. 85. – P. 117–123.
13. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments / R.C. Melo, L.A. Spencer, S.A. Perez et al. // *J. Traffic.* – 2005. – V. 6. – P. 1047–1057.

Поступила 11.11.2014.