

УДК 616-002.5:615.015.6:616.155.32:616-092.4:576.53

## ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА ПРИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Писаренко М.С.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, e-mail: marisabel4603@yandex.ru

Проанализированы субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и секреция IFN- $\gamma$  в условиях IL-12/IL-27-индукции клеток *in vitro* у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких с лекарственной устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии. Показано, что гиперсекреция IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* при направленной индукции клеток в случае инфильтративного туберкулеза легких регистрируется на фоне снижения численности IFN- $\gamma^+$  и CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов. Гиперпродукция исследуемого цитокина при диссеминированной форме заболевания на фоне снижения содержания CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов сопровождается увеличением количества IFN- $\gamma^+$ , а также CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  клеток. В целом полученные данные указывают на неоднозначный вклад различных субпопуляций лимфоцитов в гиперсекрецию IFN- $\gamma$  при инфильтративной и диссеминированной формах лекарственно-устойчивого туберкулеза легких.

**Ключевые слова:** интерферон-гамма, туберкулез легких

## PECULIARITIES OF IFN- $\gamma$ SECRETION IN DRUG-RESISTENT PULMONARY TUBERCULOSIS

Pisarenko M.S.

SBEI of HPE «Siberian State Medical University» of the Ministry of Health Care of the Russian Federation, Tomsk, e-mail: marisabel4603@yandex.ru

The subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes as well as IFN- $\gamma$  secretion in conditions of IL-12/IL-27-cell induction *in vitro* were analyzed in patients with infiltrative and disseminated pulmonary tuberculosis with drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to preparations of etiotropic therapy. It was demonstrated that hypersecretion of IFN- $\gamma$  by blood lymphocytes *in vitro* in directed cell induction in case of infiltrative pulmonary tuberculosis is registered against the background of a decrease in the amount of IFN- $\gamma^+$  and CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  lymphocytes. Overproduction of the researched cytokine in the disseminated form of the disease against the background of a fall in the concentration of CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  lymphocytes is accompanied by a rise in the number of IFN- $\gamma^+$  and also CD3 $^+$ IFN- $\gamma^+$  cells. As a whole the received data points at the ambivalent contribution of various lymphocyte subpopulations into hypersecretion of IFN- $\gamma$  in the infiltrative and disseminated forms of drug-resistant pulmonary tuberculosis.

**Keywords:** interferon-gamma, pulmonary tuberculosis

Основная протективная роль в иммунном ответе при туберкулезной инфекции принадлежит специфическому клеточно-опосредованному иммунному ответу, главным компонентом которого выступают Т-хелперы типа 1 (Th1). Данному типу лимфоцитов отводится особая значимость в аспекте туберкулеза легких (ТЛ) за их способность секретировать интерферон (IFN)  $\gamma$ , с которым связывают развитие широкого спектра механизмов антимикобактериальной защиты [2]. Данный цитокин вырабатывается активированными Т-клетками и является мощным фактором активации макрофагов, их метаболизма и бактерицидной функции, оказывая в целом стимулирующее влияние на формирование клеточного иммунитета [1, 4].

**Цель исследования** – оценить субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и уровень секреции ими IFN- $\gamma$  при лекарственно-устойчивом инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких.

### Материал и методы исследования

Обследовано 46 пациентов (37 мужчин и 9 женщин в возрасте 20–55 лет) с впервые выявленным

лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТЛ, которые в зависимости от клинической формы заболевания были разделены на группы с инфильтративным ТЛ (22 пациента) и с диссеминированным ТЛ (24 пациента). Группу сравнения составили 35 здоровых доноров с аналогичными возрастными характеристиками. Материалом для исследования служили лимфоциты венозной крови больных ТЛ и здоровых доноров. Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho = 1,077$  г/см $^3$ ). Для выделения лимфоцитов из культуры мононуклеарных клеток использовали метод адгезии к пластику.

В качестве специфических индукторов лимфоцитов использовались рекомбинантные цитокины IL-12 и IL-27 (eBioscience Company, США; в дозе 20 и 10 нг/мл соответственно). Для определения внутриклеточного IFN- $\gamma$  культивирование лимфоцитов проводили в полной питательной среде в CO $_2$ -инкубаторе при температуре 37°C в течение 8 ч с поэтапным добавлением индукторов и блокатора внутриклеточного транспорта моноклина («Sigma», США; в дозе 5 мкг/мл). Для исследования секреции IFN- $\gamma$  лимфоциты инкубировали в полной питательной среде в CO $_2$ -инкубаторе при температуре 37°C в течение 48 ч (без и в присутствии индукторов) соответственно.

Процедура определения поверхностных молекул CD3 и внутриклеточного IFN- $\gamma$  включала в себя

Fc-блокировку клеток, фиксацию, пермеабиллизацию и окрашивание специфическими моноклональными антителами. Исследование осуществляли методом двухцветной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием изотипических контролей («R&D Systems», США).

Уровень базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  оценивали в супернатантах культуральных суспензий лимфоцитов с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA), согласно рекомендациям фирмы-производителя («Cusabio Biotech», США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных алгоритмов биометрии.

### Результаты исследования и их обсуждение

Исследование секреции IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* выявило высокий базальный ее уровень у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы заболевания по сравнению с показателями у здоровых добровольцев (табл. 1). IL-12/IL-27-индукция лимфоцитов *in vitro* приводила к увеличению секреции IFN- $\gamma$  как при инфильт-

ративном ТЛ (в 2,1 раза,  $p_3 < 0,001$ ), так и при диссеминированном ТЛ (в 3,0 раза,  $p_3 < 0,001$ ) по отношению к базальному ее уровню, а также по сравнению с величиной аналогичного показателя в группе контроля (в 3,1 и 4,7 раза соответственно,  $p_1 < 0,001$ ). При этом диссеминированный ТЛ характеризовался максимальной величиной индуцированной секреции изучаемого цитокина (табл. 1).

На фоне описанных изменений продукции IFN- $\gamma$  *in vitro* у больных ЛУТЛ в случае диссеминированной формы заболевания регистрировалось увеличение относительного количества всех IFN- $\gamma$ -позитивных лимфоцитов ( $p_1 < 0,001$ ). При инфильтративной форме ЛУТЛ изменений в численности IFN- $\gamma^+$  клеток не отмечалось. В то же время как при инфильтративном, так и при диссеминированном ЛУТЛ фиксировалась Т-лимфоцитопения (снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup> клеток), наиболее выраженная у пациентов с диссеминированной формой заболевания ( $p_1 < 0,001$ ).

Таблица 1

Секреция IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	Базальная секреция, пг/мл	IL-12/IL-27-индуцированная секреция, пг/мл
Здоровые доноры	33,11 (17,94–40,15)	65,30 (59,28–85,34) $p_3 < 0,001$
Инфильтративный туберкулез легких	96,85 (61,40–114,50) $p_1 < 0,001$	202,18 (170,10–248,11) $p_1 < 0,001$ ; $p_3 < 0,001$
Диссеминированный туберкулез легких	101,47 (68,66–127,12) $p_1 < 0,001$	305,38 (201,43–373,02) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,05$ ; $p_3 < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых добровольцев;  $p_2$  – по сравнению с показателями у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – по сравнению с показателями базальной секреции цитокина.

В ходе исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови (табл. 2) у больных ЛУТЛ независимо от клинической формы заболевания было выявлено уменьшение относительного количества CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов по сравнению с показателем в группе контроля ( $p_1 < 0,001$ ). При этом в обеих группах больных ТЛ регистрировалось увеличение процентного числа CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов относительно нормальных значений ( $p_1 < 0,001$ ), наиболее выраженное при диссеминированной форме ЛУТЛ (табл. 2). Кроме того, у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ в отличие от показателей у здоровых доброволь-

цев и больных с инфильтративной формой заболевания отмечалось снижение численности CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов ( $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 < 0,001$ ) на фоне повышенного содержания CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma^-$  клеток ( $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 < 0,001$ ) (табл. 2).

Таким образом, ЛУТЛ характеризуется гиперсекрецией IFN- $\gamma$  *in vitro*, снижением числа CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma^+$  лимфоцитов и увеличением доли IFN- $\gamma$ -позитивных клеток, не несущих на своей поверхности CD3-маркер, на фоне общей Т-лимфоцитопении. Наиболее ярко данные изменения представлены при диссеминированной форме заболевания и дополняются снижением количества

CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  (чем объясняется большая выраженность Т-лимфоцитопении при данной форме заболевания), а также увеличением доли CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$  клеток.

В целом обнаруженная при ТЛ гиперпродукция IFN- $\gamma$  подтверждается данными литературы [5]. Однако, принимая во внимание зарегистрированное в настоящем исследовании снижение числа CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов на фоне гиперпродукции IFN- $\gamma$

*in vitro*, можно предположить существенный вклад в секрецию цитокина лимфоцитов, не несущих на своей поверхности CD3-маркер, в частности, натуральных киллеров (NK), увеличение численности и усиление IFN- $\gamma$ -продуцирующей активности которых выявлено при ТЛ [1, 5, 7]. Данные клетки могут входить в пул CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов, повышенное содержание которых было установлено в настоящем исследовании.

Таблица 2

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> , %	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ , %	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ , %	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> , %
Здоровые доноры	34,05 (31,72–39,17)	40,80 (35,43–44,59)	13,89 (6,54–18,18)	11,55 (9,38–12,48)
Инfiltrативный туберкулез легких	25,74 (22,25–31,68) $p_1 < 0,001$	40,03 (37,27–43,47)	14,04 (9,35–21,08)	19,40 (16,52–20,39) $p_1 < 0,001$
Диссеминированный туберкулез легких	23,19 (15,03–24,81) $p_1 < 0,001$	20,75 (16,82–28,62) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	28,35 (25,38–37,14) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	24,56 (21,44–26,40) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Тем не менее, говоря об инfiltrативном ТЛ, важно отметить, что он является классическим примером заболевания, иммунный ответ при котором протекает по Th1-зависимому пути [5]. Диссеминированный ТЛ, в свою очередь, является примером ареактивного течения инфекционного процесса с формированием патологической «иммунной девиации» в направлении Th2-зависимого ответа. Бактериemia, являющаяся обязательным фактором развития данной клинической формы ТЛ, способствует запуску Th2-иммунного ответа и активации различных Th1-иммуносупрессорных факторов [3, 6]. Так, показано, что течение диссеминированного ТЛ сопровождается увеличением в крови численности Т-регуляторных клеток (Treg), опосредующих свой супрессорный эффект посредством экспрессии ингибиторных молекул (CTLA-4) и секреции иммуноцитоклинов (интерлейкина (IL) 10, трансформирующего фактора роста (TGF)  $\beta$  и др.) [9]. Кроме того, в последнее время появилась информация о IFN- $\gamma$ -продуцирующей способности Treg [2, 6, 10]. Однако секретированными ими IFN- $\gamma$ , как предполагается, является ингибитором активации Th1-лимфоцитов, угнетает пролиферацию и дифференцировку наивных Т-клеток и индуцирует их преждевременную гибель путем апоптоза [2, 10, 11]. Наибольшая выраженность установленных изменений при диссеминированном ЛУТЛ, в частности, более значимые (отно-

сительно показателей при инfiltrативной форме ЛУТЛ) уровень секреции IFN- $\gamma$  *in vitro* и Т-лимфоцитопения, позволяет предположить вклад в IFN- $\gamma$ -продукцию при данной форме заболевания не только НК-клеток, но и Treg. Кроме того, в настоящее время активно изучаются натуральные киллерные Т-клетки (NKT), способные секретировать IFN- $\gamma$ , численность которых также увеличивается при туберкулезной инфекции [7, 8].

Вместе с тем, рассуждая о вкладе Treg и NKT-клеток в гиперсекрецию IFN- $\gamma$  при ТЛ, необходимо отметить, что они, как и Th1-лимфоциты, имеют CD3<sup>+</sup>-иммунофенотип. Следовательно, мы лишь условно можем говорить о перераспределении в субпопуляционном составе Т-клеток, сопровождающемся снижением количества и активности Th1-лимфоцитов на фоне увеличения содержания и функциональной активности Treg и NKT-клеток.

### Заключение

Лекарственно-устойчивый туберкулез легких сопровождается усилением базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* с максимальной выраженностью изменений при диссеминированной форме заболевания. Гиперсекреция IFN- $\gamma$  *in vitro* сопряжена с низким содержанием CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов и увеличением доли CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> на фоне общей Т-лимфоцитопении.

## Список литературы

1. Абатуров А.Е. Роль интерферонов в защите респираторного тракта. Каскад возбуждения системы интерферонов // Здоровье ребенка. – 2007. – Т.5, № 8. – С. 93–101.

2. Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Кошкина А.А., Чурина Е.Г. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–86.

3. Мишин В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких на основе принципов доказательной медицины // Consilium medicum. – 2008. – Т.10, № 3. – С. 20–25.

4. Уразова О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 5–13.

5. Хасанова Р.Р., Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К., Колосова А.Е., Стамбула Ю.В., Серебрякова В.А., Наследникова И.О., Колоколова О.В., Васильева О.А., Будкина Т.Е. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 3. – С. 31–35.

6. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Кононова Т.Е. // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т.12, № 1. – С. 143–146.

7. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Наследникова И.О., Воронкова О.В. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 138–143.

8. Jin I.S., Kang Tae-Jin, Lee Seong-Beom, Kim Chi-Hong, Lee Sang-Haak, Manjunatha M.V., Evan R.S., Bing C., Illarionov P.A., Gurdyal S.B., William R.J.Jr., Chae Gue-Tae, Steven A.P. // Clinical Immunology. – 2008. – Vol. 127. – P. 214–224.

9. Lee D.C., Harker J.A., Tregoning J.S., Atabani S.F., Johansson C., Schwarze J., Openshaw P.J. // J. Virol. – 2010. – Vol. 84, № 17. – P. 8790–8798.

10. Venigalla R.K., Guttikonda P.J., Eckstein V., Ho A.D., Sertel S., Lorenz Hanns-Martin, Tretter T. // Journal of Autoimmunity. – 2012. – № 39. – P. 377–387.

11. Wood K., Sawitzki B. Interferon-gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T-cells in vivo // Trends Immunol. – 2006. – Vol.27, № 4. – P. 183–187.

## References

1. Abaturov A.E. Zdorove rebenka, 2007, vol.5, no. 8, pp. 93–101.

2. Esimova I.E., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Khasanova R.R., Koshkina A.A., Churina E.G. Byulleten sibirskoy meditsyny, 2012, no.3, pp. 79–86.

3. Mishin V.Yu. Consilium medicum, 2008, vol.10, no. 3, pp. 20–25.

4. Urazova O.I. Byulleten sibirskoy meditsyny, 2010, no. 5, pp. 5–13.

5. Khasanova R.R., Voronkova O.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Strelis A.K., Kolosova A.E., Stambula Yu.V., Serebryakova V.A., Naslednikova I.O., Kolokolova O.V., Vasileva O.A., Budkina T.E. Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh, 2008, no.3, pp. 31–35.

6. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Kononova T.E. Byulleten sibirskoy meditsyny, 2013, vol.12, no.1, pp. 143–146.

7. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Naslednikova I.O., Voronkova O.V. Byulleten sibirskoy meditsyny, 2010, no. 5, pp. 138–143.

8. Jin I.S., Kang Tae-Jin, Lee Seong-Beom, Kim Chi-Hong, Lee Sang-Haak, Manjunatha M.V., Evan R.S., Bing C., Illarionov P.A., Gurdyal S.B., William R.J.Jr., Chae Gue-Tae, Steven A.P. Clinical Immunology, 2008, vol.127, pp. 214–224.

9. Lee D.C., Harker J.A., Tregoning J.S., Atabani S.F., Johansson C., Schwarze J., Openshaw P.J. J. Virol., 2010, Vol. 84, no.17, pp. 214–224.

10. Venigalla R.K., Guttikonda P.J., Eckstein V., Ho A.D., Sertel S., Lorenz Hanns-Martin, Tretter T. Journal of Autoimmunity, 2012, no.39, pp. 377–387.

11. Wood K., Sawitzki B. Trends Immunol., 2006, Vol. 27, no.4, pp. 183–187.

## Рецензенты:

Воронкова О.В., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск;

Наследникова И.О., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 07.08.2013.