

На правах рукописи

Серебрякова Валентина Александровна

**РЕАКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”

Научные руководители:

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

Новицкий Вячеслав Викторович

доктор медицинских наук

Уразова Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Степовая Елена Алексеевна

кандидат медицинских наук

Фомина Татьяна Ивановна

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”

Защита состоится «___» _____ 2006 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан «___» _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным эпидемиологических исследований, ежегодно от туберкулеза погибают более 3 млн. человек, отмечается рост и ухудшение структуры заболеваемости туберкулезом, прежде всего за счет остро прогрессирующих его форм (казеозная пневмония, фиброзно-кавернозный и диссеминированный туберкулез) [Комогорова Е.Э. и соавт., 2005].

Основной причиной прогрессирующего течения туберкулезной инфекции и увеличения смертности от туберкулеза во всем мире является рост числа и распространенности в человеческой популяции штаммов микобактерий туберкулеза, моно- и полирезистентных к специфическим противотуберкулезным препаратам [Чуканов В.И., 2004].

Установлено, что лекарственная устойчивость возбудителя развивается в результате одной или нескольких спонтанных мутаций в независимых генах микобактерий, которые, как правило, формируются под воздействием неадекватной лекарственной терапии [Краснов В.А., Урсов И.Г., 2004]. Не исключается также, что появление и размножение лекарственно-устойчивых форм возбудителя является следствием ослабления иммунного надзора организма. В связи с этим, несмотря на ключевую роль микобактерий и их биологических свойств в возникновении и определении характера течения туберкулезной инфекции, немаловажное значение отводится также механизмам иммунной дисрегуляции [Сахно Л.В. и соавт., 2006].

Согласно современным представлениям, основная роль в элиминации патогена при туберкулезной инфекции принадлежит широкому спектру эффекторных клеток адаптивного иммунитета (Т- и В-лимфоцитам) и естественной резистентности (фагоцитам, “натуральным киллерам”) [Сахно Л.В. и соавт., 2005, 2006]. При этом наиболее характерными признаками дисрегуляции иммунных процессов при туберкулезе являются, прежде всего, нарушения структурно-метаболического и функционального статуса лимфоцитов и моноцитов [Чучалин А.Г., 2004].

Комбинированная контролируемая химиотерапия занимает ведущее место в комплексе методов лечения туберкулеза [Мишин В.Ю., Степанян И.Э., 2000]. Однако приоритет в оценке её эффективности принадлежит в основном клинико-рентгенологическим и микробиологическим данным. При этом практически не учитываются индуцированные сочетанным инфекционным и лекарственным воздействием нарушения реакций приобретенного иммунитета, которые

рассматриваются в последнее время как один из важных факторов, предопределяющих реактивацию туберкулезной инфекции и её неблагоприятное течение [Черных Е.Р. и соавт., 2002].

В связи с вышеизложенным, для комплексной оценки специфического противотуберкулезного иммунитета следует иметь представление о функционировании как клеточных, так и гуморальных его звеньев, поскольку их состоянием определяется возможность развития туберкулеза легких, а также особенности его течения и исходов [Каминская Г.О. и соавт., 2001]. Кроме того, существует настоятельная необходимость изучения механизмов формирования иммунопатологических реакций при туберкулезе на фоне противотуберкулезной терапии, поскольку одной из причин низкой эффективности лечения туберкулезной инфекции может являться токсическое влияние химиопрепаратов на систему неспецифической резистентности и специфического иммунитета [Аверченков В.М. и соавт., 1998; Гольев С.С., 2000].

Цель исследования. Установить общие закономерности и особенности нарушений структурно-функционального статуса лимфоцитов периферической крови у больных с различными формами лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких до и на фоне противотуберкулезной терапии.

Задачи исследования:

1. Вскрыть механизмы и провести сравнительную оценку параметров нарушений специфического иммунного ответа у больных туберкулезом легких и у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в стадии обострения.
2. Установить особенности субпопуляционного состава и функций лимфоцитов периферической крови у больных с различными формами туберкулеза легких, выделяющих лекарственно-чувствительные и лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулеза.
3. Оценить характер и выраженность нарушений реактивности лимфоцитов периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких на этапах интенсивной и поддерживающей специфической противотуберкулезной терапии.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение клеточного и гуморального звеньев иммунитета при различных клинических формах лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого распространенного деструктивного туберкулеза легких до лечения и на фоне противотуберкулезной

химиотерапии. Установлено, что изменения лейкоцитарной формулы, CD-популяционного состава, функций лимфоцитов и цитокинсекретирующей активности мононуклеарных клеток при лекарственно-чувствительном и при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких являются однонаправленными. Впервые показано, что формирование T-дефицита у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких обуславливается снижением числа не только CD3⁺- и CD4⁺-лимфоцитов, но и количества клеток, экспрессирующих CD38-антиген. Обнаружено, что течение инфильтративного туберкулеза легких сопровождается наиболее значительным угнетением пролиферативной активности лимфоцитов, нежели при диссеминированной и фиброзно-кавернозной формах инфекции. Впервые показано, что специфическим признаком иммунного дисбаланса при туберкулезной инфекции является снижение в периферической крови количества CD3⁺-, CD38⁺-T-лимфоцитов при одновременном увеличении численности CD25⁺ (IL-2R⁺)-клеток на фоне пониженной продукции мононуклеарными лейкоцитами IL-2. Впервые продемонстрировано, что у больных лекарственно-резистентным туберкулезом легких стимулированная секреция мононуклеарными клетками крови T-активирующих цитокинов (IL-1 β , IL-2, IFN γ) существенно ниже, а секреция IL-4 и пролиферативная активность лимфоцитов, напротив, выше, чем при лекарственно-чувствительном варианте инфекции. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что дезорганизация субпопуляционного состава, угнетение пролиферативной и иммуноглобулинсинтезирующей активности лимфоцитов, а также дисбаланс продукции T- и B-регуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови при лекарственно-чувствительном и резистентном к терапии туберкулезе легких имеют место не только в период разгара клинической картины болезни, но и сохраняются после интенсивной и поддерживающей фаз противотуберкулезной химиотерапии.

Практическая значимость. Полученные новые данные фундаментального характера о механизмах формирования нарушений популяционного состава и функциональной активности лимфоцитов крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких, регистрируемые как до, так и на фоне специфической терапии, расширяют существующие представления об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции и могут служить основой для дальнейшего изучения механизмов изменений параметров иммунного статуса при туберкулезе легких, а также влияния

противотуберкулезной терапии на состояние иммунологической реактивности. Результаты исследования теоретически обосновывают необходимость включения в стандартную программу лечения больных туберкулезом легких иммуномодулирующих препаратов для профилактики и коррекции иммунодефицитных состояний, обусловленных влиянием не только возбудителя, но и противотуберкулезных препаратов. Полученные данные могут быть положены в основу разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения туберкулеза легких, а также способов профилактики и коррекции иммунопатологических осложнений антимикобактериальной терапии.

Положения, выносимые на защиту:

1. В основе нарушений специфического иммунного ответа у больных с различными клиническими формами лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких лежит гипосекреция Т-активирующих цитокинов (IL-1 β , IL-2) мононуклеарами крови, сопровождающаяся дезорганизацией субпопуляционного состава лимфоцитов, депрессией Т-клеточного иммунитета в сочетании с напряженностью гуморального звена иммунной системы.
2. Специфическим признаком иммунного дисбаланса при туберкулезе легких является сочетанное снижение количества CD3⁺-, CD38⁺-Т-лимфоцитов и увеличение числа CD25-экспрессирующих клеток при пониженной базальной секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови.
3. Степень выраженности иммунопатологических признаков при туберкулезе легких определяется вариантом течения (с лекарственной чувствительностью или лекарственной устойчивостью возбудителя) и клинической формой заболевания.
4. Стандартная противотуберкулезная химиотерапия сопровождается тенденцией к нормализации общего количества лимфоцитов, их CD-фракционного состава, содержания циркулирующих иммунных комплексов и продукции мононуклеарами крови IL-1 β - одного их основных лимфоцитаактивирующих факторов, что доказывает определяющую роль возбудителя в формировании иммунных нарушений при туберкулезе легких. Об иммунотоксическом действии противотуберкулезных препаратов свидетельствует угнетение пролиферативной и IgA- и IgM-секретирующей активности лимфоцитарных клеток периферической крови.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2005), Международном конгрессе «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (Москва, 2005), VI конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005), Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы выявления, диагностики и лечения туберкулеза» (Санкт-Петербург, 2006), XI Международном конгрессе по реабилитации в медицине и иммунореабилитации, IV Европейском конгрессе по астме (Испания, 2006), научных семинарах кафедр патологической физиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава» (Томск, 2004-2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 4 в центральных рецензируемых журналах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 229 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 16 таблицами. Библиографический указатель включает 292 источника, из них 149 отечественных и 143 зарубежных.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе приведены результаты комплексного исследования субпопуляционного состава и функциональных особенностей лимфоцитов у 247 впервые выявленных больных с распространенным деструктивным туберкулезом легких (ТЛ) мужского и женского пола в возрасте от 18 до 60 лет. Обследованные пациенты находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице (гл. врач - к.м.н. Г.В. Янова) во фтизиатрических отделениях №1 (зав. отд. - О.И. Новосельцева), №2 (зав. отд. - Т.З. Малиновская), №3 (зав. отд. - А.А. Янов). Амбулаторно больные наблюдались в Томском областном противотуберкулезном диспансере (гл. врач - Заслуженный врач РФ Г.Г. Перемитин).

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

Клиническая картина распространенного деструктивного туберкулеза легких

характеризовалась наличием синдрома воспалительной интоксикации (повышение температуры тела, ночные поты, озноб, повышенная утомляемость, слабость, снижение или отсутствие аппетита, потеря массы тела, тахикардия) и бронхолегочных симптомов (кашель более двух-трех недель, выделение мокроты, кровохарканье, одышка, боль в грудной клетке, связанная с дыханием). Бактериовыделение регистрировалось у 100% обследованных пациентов.

В зависимости от чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) все больные были распределены на две группы: первую группу составили 136 пациентов, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ), чувствительные к основным противотуберкулезным препаратам, во вторую группу были включены 111 больных, выделяющих МБТ, устойчивые как минимум к трем препаратам - изониазиду, рифампицину, стрептомицину (множественная лекарственная устойчивость). Лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза определяли традиционным методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена.

Больные с распространенным деструктивным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких на основании данных рентгенологического исследования легких были подразделены на подгруппы: из 136 пациентов, страдающих лекарственно-чувствительным туберкулезом легких, у 52 был диагностирован инфильтративный ТЛ, у 49 больных - диссеминированный ТЛ и у 35 пациентов - фиброзно-кавернозный ТЛ; из 111 больных лекарственно-устойчивым ТЛ у 50 был выявлен инфильтративный ТЛ, у 41 пациента - диссеминированный ТЛ и у 20 больных - фиброзно-кавернозный ТЛ.

Для лечения больных ТЛ были использованы стандартные режимы химиотерапии, основанные на двухфазном назначении противотуберкулезных препаратов: 1 фаза - интенсивная химиотерапия, 2 фаза - поддерживающая химиотерапия. В интенсивную фазу лечения пациенты ежедневно получали комбинацию "изониазид (300 мг) + рифампицин (600 мг) + пиразинамид (2000 мг) + этамбутол (1200 мг) + стрептомицин (1000 мг)". В случае отрицательного результата посева мокроты на лекарственную устойчивость МБТ интенсивный курс терапии продолжался в течение 2-3 месяцев до выявления прекращения бактериовыделения и положительной клинико-рентгенологической динамики. При выявлении лекарственной резистентности МБТ проводилась коррекция назначенной схемы лечения. При этом интенсивная фаза химиотерапии включала комбинацию из пяти ПТП "офлоксацин (800 мг) + циклосерин (750 мг) +

канамицин/капреомицин (1000 мг) + протионамид/этионамид (750 мг) + парааминосалициловая кислота (800 мг)” и проводилась в течение 6 месяцев.

При наступлении стойкого абацилирования, улучшении клинического состояния и инволюции специфического процесса в легких больные лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ) переводились на поддерживающий курс терапии. Пациенты, страдающие ЛЧТЛ в фазу продолжения лечения (4–6 месяцев) ежедневно получали изониазид (300 мг) и рифампицин (600 мг). Больным ЛУТЛ назначалась комбинация из четырех ПТП “офлоксацин (800 мг) + циклосерин (750 мг) + протионамид/этионамид (750 мг) + парааминосалициловая кислота (800 мг)”, которые применялись не менее 12 месяцев.

Контрольные группы составили 25 здоровых доноров в возрасте от 18 до 60 лет мужского и женского пола и 21 пациент аналогичного возраста с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Острые респираторные вирусные и бактериальные инфекции у обследованных здоровых лиц отмечались не чаще 1-3 раз в год. Последний эпизод манифестации острой респираторной вирусной инфекции регистрировался не ранее, чем за 4 месяца до обследования.

Исследование иммунологических показателей у пациентов контрольных групп проводили однократно (у больных ХОБЛ в стадии обострения до лечения), у больных туберкулезом легких: 1) до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии; 2) после курса интенсивной противотуберкулезной химиотерапии; 3) после курса поддерживающей противотуберкулезной химиотерапии.

Определение общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного числа их отдельных морфологических форм проводили общепринятыми гематологическими методами исследования [Меньшиков В.В., 1987].

Выделение мононуклеаров периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Для стимуляции секреторных способностей мононуклеаров в пробы вносили 10 мкг/мл липополисахарида *Escherichia coli* 026:B6 (ЛПС) (“Sigma”, США), туберкулин в дозе 500 ТЕ и 30 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) (“Becton Dickinson”, Германия) [Хаитов Р.М. и соавт., 1995]. Продукцию мононуклеарными лейкоцитами интерлейкинов (IL) -1 β , -2, -4 и интерферона (IFN) γ оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода. Процедура выполнения иммуноферментного анализа проводилась по инструкциям, предлагаемым производителем тест-систем («Протеиновый контур», Санкт-Петербург, Россия).

Определение содержания CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-, CD25⁺-, CD38⁺-лимфоцитов в крови проводили с помощью метода иммунофлуоресценции с использованием тест-систем фирмы «МедБиоСпектр» (Москва, Россия).

Пролиферативную способность лимфоцитов оценивали с помощью МТТ-теста [Carmichael J., 1987]. Результаты теста выражали в единицах оптической плотности.

Концентрацию иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови определяли по методу Ю.А. Гриневича и соавт. [1981].

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Statistica for Windows» (Version 5.0) фирмы «StatSoft Inc.» и пакета программ «Microsoft Excel» (2000) корпорации «Microsoft». Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Степень зависимости между различными параметрами внутри исследуемых групп оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена. Корреляцию считали значимой при p -уровне $< 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности реактивности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения. Исследование общего количества лейкоцитов (ОКЛ) и лейкоцитарной формулы периферической крови показало, что у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ изменения показателей гемограммы были однонаправленными и выражались увеличением ОКЛ, содержания палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, моноцитов, а также снижением количества лимфоцитов относительно контрольных значений. На основании полученных данных можно предположить, что туберкулезная инфекция сопровождается депрессией лимфоидного ростка кроветворения, вероятно, за счет цитотоксического, антипролиферативного и мутагенного действия микробных токсинов, а также

активацией гранулоцитарного и моноцитарного ростков посредством повышенного образования и усиленной дифференцировки клеток-предшественниц грануло- и моноцитопоэза.

Дисбаланс субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с различными формами лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого ТЛ характеризовался снижением относительного и абсолютного количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD38⁺-клеток и увеличением числа лимфоцитов, экспрессирующих CD16-, CD20- и CD25-антигены (рис. 1). Количество CD8⁺-лимфоцитов было сопоставимо с нормой (за исключением его снижения у больных фиброзно-кавернозным ЛЧТЛ) (рис. 1). При этом, у пациентов с ХОБЛ число CD25-позитивных клеток, а также количество лимфоцитов, несущих CD3- и CD38-антигены, соответствовало нормальным значениям (рис. 1), что позволило определить вышеуказанные изменения (снижение числа CD3⁺-, CD38⁺- и увеличение количества CD25⁺-лимфоцитов) как специфичные для туберкулезной инфекции.

Известно, что основная роль в формировании противотуберкулезного иммунитета, развивающегося по типу замедленной гиперчувствительности, принадлежит макрофагам и Т-лимфоцитам-хелперам 1 типа (Th1) [Dong Y. et al., 2004]. Секретируемые преимущественно Th1-лимфоцитами IFN γ и IL-2 обеспечивают в организме высокую активность “вспомогательных” клеток и эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, поддерживая тем самым клеточный иммунный ответ [Кашкин К.П., 1998].

Установленное нами как при чувствительном, так и при устойчивом ТЛ снижение уровня спонтанной продукции IL-1 β и IL-2 (рис. 4А) свидетельствует об угнетении цитокинсекретирующей функции мононуклеаров и может служить одним из факторов, определяющих несостоятельность защитного потенциала Th1-лимфоцитов.

Добавление в культуры клеток фитогемагглютинаина (ФГА) в случае ЛЧТЛ сопровождалось снижением продукции IL-2, а стимуляция туберкулином (ППД), напротив, увеличением интенсивности его секреции на фоне сравнимой с нормой ФГА- и ППД-стимулированной продукции IFN γ и IL-4 (рис. 4Б, 4Г). У пациентов, страдающих ЛУТЛ, отмечалось увеличение секреции важнейшего регулятора гуморального иммунного ответа - IL-4 (под воздействием ФГА) - при одновременном снижении ФГА- и ППД-стимулированной продукции IL-2 и IFN γ , являющихся ключевыми цитокинами клеточного звена иммунитета (рис. 4Б, 4Г). По-видимому, длительная иммунологическая реакция против МБТ определяет

долгое пребывание Th1-лимфоцитов в состоянии противомикробной агрессии, что сопровождается постепенным истощением резерва их реактивности.

При стимуляции мононуклеарных клеток липополисахаридом (ЛПС) обнаруживалось увеличение продукции $IFN\gamma$ и $IL-4$ как при чувствительном, так и при устойчивом варианте инфекции (рис. 4B). Показано, что ЛПС способен вызывать неспецифическую пролиферацию и дифференцировку В-клеток *in vivo* и *in vitro*, при этом активированные В-лимфоциты в различных экспериментальных условиях способны выделять практически все цитокины, продуцируемые Т-лимфоцитами [Потапнев М.П., 1994; Фрейдлин И.С., 1999; Смирнов В.С., Фрейдлин И.С., 2000]. Следовательно, можно предположить, что увеличение концентрации $IL-4$ при ЛПС-стимуляции у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ служит свидетельством активации гуморального звена иммунитета и может рассматриваться в качестве фактора, обуславливающего увеличение количества $CD20^+$ -лимфоцитов в периферической крови. В частности, у пациентов с ЛУТЛ до начала лечения отмечалась положительная зависимость между уровнем ЛПС-индуцированной секреции $IL-4$ и относительным количеством $CD20^+$ -лимфоцитов ($r=0,60$; $p<0,05$).

Сравнение иммуноцитокينوвого статуса у больных ТЛ в зависимости от чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам позволило установить, что при лекарственно-устойчивом варианте инфекции уровень секреции $IL-1\beta$ (при ЛПС-стимуляции), $IL-2$ и $IFN\gamma$ (при индукции ФГА и ППД) был ниже, а уровень продукции $IL-4$ (при стимуляции ФГА и ЛПС), напротив, превышал соответствующие значения у пациентов с восприимчивостью возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

Сравнительный анализ цитокинпродуцирующей функции мононуклеаров у больных ТЛ и у пациентов с ХОБЛ показал, что специфичным для туберкулезной инфекции было угнетение уровня базальной секреции $IL-2$ (рис. 4A).

Изучение пролиферативной активности лимфоцитов позволило установить, что у больных ЛЧТЛ вне зависимости от формы заболевания и у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ регистрировалось снижение показателей спонтанной бласттрансформации лимфоцитов (рис. 2). Добавление в культуры клеток ЛПС сопровождалось угнетением интенсивности бластообразования у всех обследованных больных ТЛ вне зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (рис. 2).

При стимуляции туберкулином у пациентов с ЛЧТЛ при всех клинических

формах заболевания и у больных инфильтративным и диссеминированным ЛУТЛ также отмечалось снижение интенсивности бластообразования по сравнению с нормой (рис. 2).

Несмотря на то, что ФГА-стимулированная реакция бластообразования лимфоцитов, отражающая резерв пролиферативной активности Т-клеток, соответствовала норме (рис. 2), угнетение спонтанной и ППД-стимулированной пролиферации лимфоцитов, на наш взгляд, обуславливалось, в том числе дефектами функциональной активности Т-клеток, поскольку их количество, несмотря на снижение, существенно превышало численность В-лимфоцитов. В частности, у больных ЛЧТЛ до начала терапии спонтанная пролиферативная активность лимфоцитов положительно коррелировала с относительным числом клеток, несущих CD3-антиген ($r=0,75$; $p<0,05$), а интенсивность ППД-индуцированной пролиферации лимфоцитов - с относительным количеством CD3- и CD38-позитивных клеток (соответственно $r=0,61$; $p<0,05$ и $r=0,73$; $p<0,05$).

Обращало на себя внимание то, что наиболее низкие параметры ЛПС-, ФГА- и ППД-стимулированной пролиферации лимфоцитов отмечались при инфильтративной форме ЛУТЛ (рис. 2).

Исследование спектра сывороточных иммуноглобулинов позволило выявить снижение содержания в крови у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ только IgM (рис. 3), что могло определяться не только угнетением их продукции В-лимфоцитами, но и активным включением иммуноглобулинов данного изотипа в состав циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), повышение уровня которых регистрировалось при всех клинических формах ЛУТЛ и у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ (рис. 3). В пользу данного предположения свидетельствует обнаруженная у больных диссеминированным ЛУТЛ отрицательная корреляция между концентрацией IgM и уровнем ЦИК ($r=0,77$; $p<0,05$). При этом высокий уровень иммуноглобулинов основного опсонизирующего субкласса - IgG - при фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ, а также нормальное их содержание при инфильтративной, диссеминированной формах ЛЧТЛ и при всех клинических формах ЛУТЛ (рис. 3) может расцениваться в качестве признака компенсированного функционирования гуморального звена иммунитета.

Резюмируя данные проведенного исследования, мы можем заключить, что активация МБТ и манифестация ТЛ ассоциированы с состоянием выраженной иммунодепрессии Т-звена иммунитета у инфицированных лиц в сочетании с

напряженностью гуморального иммунитета.

Особенности реактивности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких после курса интенсивной противотуберкулезной химиотерапии. Анализ лейкоцитарной формулы позволил установить тенденцию к нормализации её показателей, как при чувствительном, так и при устойчивом варианте инфекции. Вместе с тем, у пациентов с инфильтративным ТЛ (вне зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам) отмечалось явление относительной и абсолютной эозинофилии.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов констатировало увеличение абсолютного числа CD4⁺- и относительного количества CD38⁺-клеток, а также снижение процентного содержания CD20⁺-лимфоцитов на фоне лечения только у больных инфильтративной формой ЛЧТЛ, однако они так и не достигали значений нормы. У пациентов, страдающих диссеминированным и фиброзно-кавернозным ЛЧТЛ и у больных ЛУТЛ вне зависимости от формы заболевания показатели CD-фракционного состава лимфоцитов не отличались от соответствующих значений на предыдущем этапе исследования.

У больных ЛЧТЛ на фоне терапии отмечалось увеличение (до нормы) спонтанной и ЛПС-стимулированной секреции IL-1 β - одного из основных лимфоцитактивирующих факторов. Вместе с тем, регистрировались признаки угнетения резервных способностей мононуклеарных лейкоцитов: низкий уровень продукции IL-2 (при стимуляции ФГА и ЛПС) и IL-4 (при индукции ППД).

У пациентов, страдающих ЛУТЛ, активность спонтанной секреции IL-1 β была ниже нормы, а ЛПС-инициированная продукция IL-1 β и IL-4, напротив, превышала контрольные значения. Кроме того, при ЛУТЛ, наряду с нормализацией секреции IFN γ (при стимуляции ФГА и ППД), обнаруживались признаки угнетения цитокинсекретирующей функции мононуклеарных клеток: базальная и митоген-стимулированная продукция IL-2 оставались ниже нормы, а при добавлении в культуры клеток ППД регистрировалось её угнетение по сравнению с таковым на предыдущем этапе исследования.

Анализ пролиферативной активности лимфоцитов констатировал сохраняющееся угнетение интенсивности её базального уровня (относительно нормы) при всех клинических формах ЛЧТЛ. При этом пролиферативная активность клеток положительно коррелировала с интенсивностью спонтанной продукции IL-2 ($r=0,79$; $p<0,05$).

При стимуляции лимфоцитов ФГА и ЛПС у больных ЛЧТЛ вне зависимости

от формы заболевания отмечалось прогрессирующее снижение параметров бластообразования, показатели ППД-индуцированной пролиферации лимфоцитов по-прежнему не достигали нормы. При этом у пациентов с ЛЧТЛ фиксировалась положительная зависимость между пролиферативной активностью лимфоцитов в ответ на ФГА и уровнем ФГА-стимулированной секреции IL-2 ($r=0,79$; $p<0,05$).

Обращало на себя внимание, что при ЛУТЛ после завершения курса интенсивной химиотерапии практически все показатели пролиферативной активности лимфоцитов были сопоставимы с соответствующими значениями у здоровых доноров.

Кроме того, у больных ЛУТЛ вне зависимости от формы заболевания параметры ЛПС-индуцированной пролиферации лимфоцитов превышали таковые у пациентов, страдающих ЛЧТЛ. Интенсивность бластообразования при действии ФГА и туберкулина у лиц с инфильтративной и фиброзно-кавернозной формой ЛУТЛ была выше, чем у больных с одноименными формами ЛЧТЛ.

Исследование функциональной активности В-лимфоцитов констатировало, что у пациентов с ТЛ вне зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам содержание IgM в сыворотке крови не восстанавливалось, а концентрация IgG соответствовала норме. Уровень IgA в сыворотке крови у больных фиброзно-кавернозным ЛЧТЛ и ЛУТЛ, а также при инфильтративной форме ЛУТЛ был ниже контрольных значений. Наряду с этим, концентрация IgA и IgM у больных инфильтративным ЛУТЛ была ниже, чем у больных с аналогичной формой ЛЧТЛ. В случае фиброзно-кавернозного ТЛ содержание IgA в сыворотке крови при наличии лекарственной устойчивости было ниже, чем у пациентов с восприимчивостью возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

На наш взгляд, низкий уровень IgA и IgM в сыворотке крови у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ обуславливался нарушением регуляции синтеза иммуноглобулинов или их изотипов, связанным с дисбалансом иммунорегуляторных цитокинов, а также ускорением катаболизма молекул иммуноглобулинов.

Исследование содержания ЦИК показало, что после курса интенсивной химиотерапии происходила нормализация их уровня у больных инфильтративным и фиброзно-кавернозным ТЛ как при чувствительном, так и при устойчивом варианте инфекции. При диссеминированной форме ЛУТЛ уровень ЦИК приближался к значениям нормы, но все еще превышал её. В случае диссеминированного ЛЧТЛ в процессе терапии отмечалось снижение содержания

ЦИК как относительно контрольных значений, так и по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ.

Особенности реактивности лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких после курса поддерживающей противотуберкулезной химиотерапии. Анализ показателей гемограммы у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ позволил установить, что после завершения курса поддерживающей химиотерапии в целом отмечалась нормализация параметров количественного состава белой крови.

Исследование CD-фракционного спектра лимфоцитов свидетельствовало о том, что у больных инфильтративным ЛЧТЛ и у всех пациентов с ЛУТЛ происходило увеличение содержания клеток, экспрессирующих CD3-, CD4- и CD38-антигены, по сравнению с таковым до лечения, однако их число оставалось ниже нормы. Вероятно, данный факт обусловлен удалением инфекционного агента с последующей инволюцией специфического очага воспаления и снижением потребности в антигенреактивных клетках на периферии. Однако, несмотря на положительную динамику, в том числе и клиническую, у всех обследованных больных с ЛЧТЛ и ЛУТЛ число CD16⁺-, CD20⁺- и CD25⁺-лимфоцитов все еще сохранялось повышенным.

Интенсивность продукции IL-1 β (спонтанная и при стимуляции ФГА) у пациентов, страдающих ЛЧТЛ, была выше, чем соответствующие значения, регистрируемые до начала терапии, а ППД-индуцированная его секреция соответствовала норме. У больных ЛУТЛ отмечалось восстановление уровня ЛПС-, ФГА- и ППД-стимулированной секреции IL-1 β относительно такового до лечения.

Уровень спонтанной секреции IL-2 у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ оставался ниже нормы, на основании чего мы можем сделать предположение о сохраняющейся после лечения депрессии функциональной активности Th1-лимфоцитов. Исследование ФГА-стимулированной продукции IL-2 позволило установить, что у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ её значения также оставались ниже нормы. Кроме того, у пациентов с ЛУТЛ при добавлении в культуры клеток ФГА регистрировалось снижение интенсивности секреции IFN γ относительно контрольных значений и показателей на предыдущих этапах исследования. Интенсивность продукции IL-2 при стимуляции мононуклеарных клеток туберкулином, как при чувствительном, так и при устойчивом варианте инфекции была ниже, чем у здоровых доноров.

Основываясь на приведенных выше результатах, мы можем заключить, что

после завершения курса поддерживающей терапии резерв цитокинсекретирующей реактивности Th1-лимфоцитов как при чувствительном, так и при устойчивом варианте перенесенной инфекции не восстанавливался.

Дальнейший анализ цитокинпродуцирующей активности лимфоцитов показал, что в процессе терапии у больных ЛЧТЛ регистрировалось снижение спонтанной и ППД-стимулированной секреции IL-4. Вместе с тем, ФГА- и ЛПС-индуцированная его продукция превышала контрольные значения.

Учитывая антагонистические отношения Th1- и Th2-субпопуляций лимфоцитов, можно предположить, что угнетение базальной продукции IL-4 у больных ЛЧТЛ обуславливалось повышением уровня спонтанной секреции IFN γ . В частности, у больных ЛЧТЛ после завершения курса поддерживающей химиотерапии отмечалась отрицательная зависимость между уровнем базальной продукции IFN γ и спонтанной секрецией IL-4 ($r=-0,71$; $p<0,05$).

В случае ЛУТЛ интенсивность базальной и ФГА-стимулированной секреции IL-4, как и на предыдущих этапах исследования, соответствовала норме. Интенсивность ЛПС-индуцированной продукции IL-4, несмотря на её снижение в процессе лечения, превышала контрольные значения. Активность туберкулин-стимулированной секреции IL-4 после завершения курса поддерживающей химиотерапии превышала не только соответствующие показатели у здоровых доноров, но и её значения на предыдущих этапах исследования.

Сравнительный анализ цитокинпродуцирующей активности мононуклеарных клеток в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам позволил установить, что у больных ЛУТЛ уровень секреции IL-1 β (при стимуляции ППД) и IFN γ (спонтанной и при стимуляции ФГА и ЛПС) был все ещё ниже, а продукция IL-4 (базальная и при стимуляции ППД), наоборот, превышала соответствующие значения у пациентов с ЛЧТЛ.

Изучение пролиферативной активности лимфоцитов показало, что у больных ЛЧТЛ вне зависимости от формы заболевания после полного курса лечения регистрировалось снижение показателей спонтанной (за исключением диссеминированного ЛЧТЛ, при котором интенсивность базального бластообразования соответствовала норме), а также ЛПС-, ФГА- и ППД-стимулированной бласттрансформации лимфоцитов, что, вероятно, можно расценивать как тяжелое последствие сначала длительной вегетации МБТ, а затем и присоединения токсического влияния химиотерапии на метаболизм иммунокомпетентных клеток.

У больных инфильтративным ЛУТЛ, несмотря на нормализацию на предыдущем этапе исследования, после завершения курса поддерживающей химиотерапии вновь отмечалось снижение показателей ППД-индуцированного бластообразования, у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ - интенсивности спонтанной и ФГА-стимулированной лимфопротиферации. Между тем, у пациентов, страдающих инфильтративным ЛУТЛ, показатели ЛПС-, ФГА- и туберкулин-стимулированной протиферации лимфоцитов превышали соответствующие значения у лиц с аналогичной формой ЛЧТЛ. При диссеминированном ЛУТЛ в случае добавления в культуры клеток ЛПС активность протиферативного ответа лимфоцитов была более высокой, чем у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ.

Определение спектра иммуноглобулинов в сыворотке крови показало, что у больных инфильтративным ЛЧТЛ в процессе терапии отмечалось снижение уровня IgM, а у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ - содержания IgA, что предположительно могло быть связано с выявленным нами увеличением спонтанной продукции IFN γ , который, как известно способствует ориентации антителогенеза на генерацию основного опсонизирующего субкласса IgG [Фрейдлин И.С., 1999; Фрейдлин И.С., Тоголян А.А., 2001], уровень которого у пациентов с инфильтративным и диссеминированном ЛЧТЛ соответствовал норме. Содержание IgA и IgM в сыворотке крови у всех обследованных больных ЛУТЛ оставалось пониженным. При этом у пациентов с ЛУТЛ фиксировалась положительная зависимость между концентрацией антител класса IgA, IgM и уровнем базальной секреции IL-2 (соответственно $r=0,88$; $p<0,05$ и $r=0,79$; $p<0,05$), который, как известно, принимает участие в регуляции экспрессии генов, контролирующих образование иммуноглобулинов. Уровень IgG в сыворотке крови у всех обследованных лиц с ЛУТЛ соответствовал норме.

Обращало на себя внимание, что у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ и с диссеминированным ЛУТЛ содержание ЦИК отвечало норме, а при инфильтративной форме ЛУТЛ отмечалась тенденция к нормализации их уровня относительно такового до лечения.

Таким образом, в процессе противотуберкулезной терапии как при чувствительном, так и при устойчивом варианте инфекции устанавливалась нормализация общего количества лимфоцитов, а также тенденция к восстановлению их субпопуляционного состава, продукции основного фактора, активирующего лимфоциты – IL-1 β , и уровня ЦИК.

Результаты проведенного исследования являются основанием для дальнейшего углубленного изучения механизмов взаимодействия МБТ и клеток иммунной системы в процессе развития туберкулезной инфекции, а также реакций системного иммунитета в условиях применения противотуберкулезных препаратов.

ВЫВОДЫ:

1. Течение лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких сопровождается однонаправленными нарушениями CD-популяционного состава и функций лимфоцитов периферической крови, степень выраженности которых определяется вариантом течения (с лекарственной чувствительностью или лекарственной устойчивостью возбудителя) и клинической формой заболевания.
2. В основе структурно-функционального дисбаланса лимфоцитарных клеток крови при туберкулезе легких лежат лимфопения, увеличение численности CD16⁺-«натуральных киллеров» и угнетение Т-клеточного звена в сочетании с напряженностью гуморального иммунитета.
3. Формирование Т-дефицита у больных туберкулезом легких обуславливается снижением числа CD3⁺-, CD4⁺-, CD38⁺-лимфоцитов и подавлением пролиферативной активности Т-клеток на фоне гипосекреции Т-активирующих факторов (IL-1 β , IL-2) мононуклеарами крови.
4. Дизрегуляция В-звена иммунитета при туберкулезе легких характеризуется увеличением численности CD20⁺-В-лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов в крови при сочетанном снижении IgM-синтезирующей и пролиферативной активности В-клеток в условиях нормальной или повышенной (при митоген-опосредованной стимуляции в случае лекарственной устойчивости возбудителя) секреции IL-4 мононуклеарными клетками крови.
5. Специфическим иммунопатологическим признаком туберкулезной инфекции является снижение количества CD3⁺- и CD38⁺-лимфоцитов при одновременном увеличении численности CD25⁺ (IL-2R⁺)-клеток на фоне пониженной базальной продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови.
6. Нарушение пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови при инфильтративном туберкулезе легких более выражено, чем при

диссеминированной и фиброзно-кавернозной его формам. При этом стимулированная секреция моноклеарными клетками крови Т-активирующих цитокинов (IL-1 β , IL-2, IFN γ) у больных лекарственно-резистентным туберкулезом легких существенно ниже, а секреция IL-4 и пролиферативная активность лимфоцитов, напротив, выше, чем при лекарственно-чувствительном варианте инфекции.

7. Прослеживаемая в процессе противотуберкулезной терапии направленность к нормализации иммунного гомеостаза связана с отчетливой тенденцией к восстановлению общей численности и CD-популяционного состава лимфоцитов, содержания циркулирующих иммунных комплексов в крови, а также продукции IL-1 β моноклеарами периферической крови.
8. Иммунодестабилизирующее действие противотуберкулезной химиотерапии характеризуется угнетением пролиферативной реакции лимфоцитарных клеток крови (более выраженным при лекарственно-чувствительном туберкулезе легких) и IgA- и IgM-секретирующей активности В-лимфоцитов. При этом уровень секреции IL-1 β и IFN γ у пациентов, страдающих лекарственно-устойчивым туберкулезом легких, остается ниже, чем при лекарственно-чувствительном варианте заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Цитокинпродуцирующая активность моноклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2005. - № 6. - С. 39-42 (соавт. В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, А.К. Стрелис и др.).
2. Особенности цитокиновой продукции при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких // Бюллетень сибирской медицины. - 2005. - Т. 4. – Прил. 1. - С. 94-95 (соавт. О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова).
3. Активность ПОЛ и апоптоза при туберкулезе легких // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2005. - Т. 140, № 11. - С. 497-499 (соавт. В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, С.Б. Ткаченко и др.).
4. Характеристика клеточно-медиаторного иммунитета при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью // Аллергология и иммунология в педиатрии (журнал Ассоциации детских аллергологов и иммунологов в России). - Т. 6, № 5. – Прил. 1. - С. 203 (соавт. О.И. Уразова, О.В. Воронкова).

5. Структурные особенности мембран мононуклеарных лейкоцитов крови при инфильтративном туберкулезе легких / Сборник материалов IV Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине. - Тула, 2005. - С. 43-44 (соавт. И.Е. Есимова, О.В. Воронкова, Т.А. Шилько и др.).
6. Особенности цитокинсекретирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких / Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005. - СПб., 2005. - С. 7-9 (соавт. О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.Е. Есимова и др.).
7. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов крови у больных туберкулезом / Медицинская иммунология. - 2005. - Т. 7, № 5-6. - С. 587-592 (соавт. В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др.).
8. Мононуклеарные клетки периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / Вестник РАМН. - 2006. - № 2. - С. 30-35. (соавт. В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.К. Стрелис и др.).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЛПС - липополисахарид
 ЛУТЛ - лекарственно-устойчивый туберкулез легких
 ЛЧТЛ - лекарственно-чувствительный туберкулез легких
 МБТ - микобактерии туберкулеза
 ОКЛ - общее количество лейкоцитов
 ППД - туберкулин
 ПТП - противотуберкулезные препараты
 ТЛ - туберкулез легких
 ФГА - фитогемагглютинин
 ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь легких
 ЦИК - циркулирующие иммунные комплексы
 CD - cell differentiation antigens - антигены дифференцировки клеток
 IFN - interferon - интерферон
 Ig - immunoglobulin - иммуноглобулин
 IL - interleukin - интерлейкин
 Th1, 2 - T-helper-1, 2 - субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов/хелперов