

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НК-КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕМАХ ЛЕГКИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ С НАЛИЧИЕМ В СТРУКТУРЕ КОМОРБИДНОСТИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Бердюгина О.В.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Интерес к изучению полиморфизма клеток иммунной системы растет с развитием в проточной цитофлуориметрии многоцветного анализа. Естественные киллеры представлены несколькими субпопуляциями. Их созревание является непрерывным процессом, который начинается с CD27⁺CD11b⁻-клетки и заканчивается зрелыми клетками с фенотипом CD27⁺CD11b⁺. Одной из областей для изучения полиморфизма НК-клеток является фтизиатрия, в связи с тем, что механизм длительного персистирования *M. tuberculosis* в организме человека до конца не изучен. Более того, появляется все больше пациентов с коморбидной инфекцией, включающей вирус иммунодефицита человека. Целью данного исследования стало определение некоторых субпопуляций НК-клеток у пациентов с туберкулемами легких при, а также в отсутствие синергичного инфицирования вирусом иммунодефицита человека.

Обследовано 46 человек, сгруппированных в три когорты. В первую группу были включены 24 практически здоровых человека, вторая группа объединила 12 больных с туберкулемами легких без клинических и лабораторных признаков наличия ВИЧ-инфекции, третья группа была представлена 10 больными с туберкулемами легких и инфицирована ВИЧ. Возбудитель туберкулеза легких у всех больных был лекарственно-устойчивым. Все больные ВИЧ-инфекцией имели 4-ю стадию заболевания. Иммунологическое исследование выполнялось методом проточной цитофлуориметрии. Детектировали следующие популяции клеток: CD45⁺CD3⁺CD19⁻, CD45⁺CD3⁻CD19⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3⁻CD8⁺, CD45⁺CD3⁻HLA-DR⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD11b⁺. Лейкоцитоз и лейкограмму определяли на клиническом анализаторе 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Poland). Статистические исследования данных выполнены в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., USA), использована компьютерная программа Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA). Оценивали нормальность распределения полученных данных. В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использованы Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}) при уровне значимости различий $p < 0,017$ (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3), а также Wald–Wolfowitz test (p_{w-w}) при уровне значимости различий $p < 0,05$ (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3). Выполнялся факторный анализ.

Установлено, что наличие туберкулем легких сопровождается снижением количества НК-клеток на 33%, двукратным понижением численности НКТ-клеток, уменьшением на 34,3% популяции CD3⁺HLA-DR⁺ клеток, снижением на 21,7% количества CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток. Наличие ВИЧ-

Адрес для переписки:

Бердюгина Ольга Викторовна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Address for correspondence:

Berdyugina Olga Viktorovna
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Ekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Образец цитирования:

О.В. Бердюгина «Гетерогенность НК-клеток при туберкулемах легких, в том числе с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 363-372. doi: 10.46235/1028-7221-231-HON
© Бердюгина О.В., 2021

For citation:

O.V. Berdyugina "Heterogeneity of NK-cells in pulmonary tuberculous granulomas, including association with HIV infection", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 363-372. doi: 10.46235/1028-7221-231-HON
DOI: 10.46235/1028-7221-231-HON

инфекции при туберкулемах легких ассоциировано с понижением количества лейкоцитов, значительной вариабельностью количества лимфоцитов, снижением числа НК-клеток в 3 раза, НК-клеток, экспрессирующих α -цепь антигена CD8 – в 2,3 раза, NKT-клеток – в 6 раз, CD3⁺HLA-DR⁺-клеток – на 42,9%, CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток – в 2,3 раза. Как у пациентов с туберкулемами легких, так и с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции отмечено снижение контроля за инфекцией *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: иммунология, проточная цитометрия, туберкулема, ВИЧ, НК-клетки, NKT-клетки, CD11b, HLA-DR, факторный анализ

HETEROGENEITY OF NK-CELLS IN PULMONARY TUBERCULOUS GRANULOMAS, INCLUDING ASSOCIATION WITH HIV INFECTION

Berdyugina O.V.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Interest in the study of cell population heterogeneity among immune system grows with advances in multicolor flow cytometry techniques. Natural killer cells are represented by several subpopulations. Their maturation is a continuous process that begins with CD27⁺CD11b⁻-cells and ends with mature cells with the CD27⁺CD11b⁺-phenotype. Phthisiology is one of the areas for studying the NK-cell polymorphism due to the fact that the mechanism of prolonged persistence of *M. tuberculosis* in the human body is not fully understood. Moreover, there is increasing number of patients with infectious comorbidities, including the human immunodeficiency virus (HIV) infection. The aim of this study was to determine some subpopulations of NK cells in the patients with pulmonary tuberculous granuloma, as well as in the absence of a synergistic HIV infection.

The study involved 46 people grouped in three cohorts. The 1st group included 24 practically healthy people, the 2nd group consisted of 12 patients with pulmonary tuberculous granuloma without clinical and laboratory signs of HIV infection, and the 3rd group was represented by 10 patients with pulmonary tuberculous granuloma infected with HIV. The causative agent of pulmonary tuberculosis in all patients was drug-resistant. All the patients with HIV infection had stage 4 disease. Immunological status was assessed by flow cytometry. The following cell populations were detected: CD45⁺CD3⁺CD19⁻, CD45⁺CD3⁻CD19⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3⁻CD8⁺, CD45⁺CD3⁻HLA-DR⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD11b⁺. Leukocytosis and leukogram were determined with a 5 Diff Mythic 22 AL clinical analyzer (Cormay, Poland). Statistical studies of the data were performed in the Windows 10 operating environment (Microsoft Corp., USA); the computer program Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA) was used. The normality of the data distribution was also evaluated. Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}) was used as criterion for assessing differences between the compared groups at a significance level of differences $p < 0.017$ (between three unrelated groups), as well as Wald–Wolfowitz test (p_{w-w}) with a significance level of differences $p < 0.05$. Factor analysis was performed.

We have found that the presence of pulmonary tuberculous granuloma is accompanied by a decrease of NK-cells number by 33%, a two-fold decrease in the number of NKT-cells, a 34.3% decrease in the population of CD3⁺HLA-DR⁺-cells, and a 21.7% decrease in the number of CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-cells. Co-infection with HIV in cases of pulmonary tuberculous granuloma was associated with a three-fold decrease in the leukocyte numbers, significant variability in lymphocyte counts, e.g., 3-fold decrease in NK-cell counts, with NK-cells expressing α -chain of the CD8 antigen decreased by 2.3 times; 6-fold drop of NKT-cell, CD3⁺HLA-DR⁺-cells decreased by 42.9%; 2.3-fold decline in CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-cells. Decreased control of *M. tuberculosis* infection was observed both in patients with pulmonary tuberculous granuloma, and in presence of HIV infection as associated comorbidity.

Keywords: immunology, flow cytometry, tuberculous granuloma, HIV, NK-cells, NKT-cells, CD11b, HLA-DR, factor analysis

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН № гос. регистрации АААА-А21-121012090091-6.

Введение

Интерес к изучению полиморфизма клеток иммунной системы возрастает с развитием в проточной цитофлуориметрии многоцветного анализа [4, 6]. Выявляемая гетерогенность описанных ранее популяций приводит к дифференциации новых типов клеток, у которых обнаруживаются индивидуальные особенности функционирования.

Естественные киллеры – клетки врожденного иммунитета, обладающие как собственным цитотоксическим потенциалом, так и способностью к продукции ряда цитокинов – представлены несколькими субпопуляциями, маркерами дифференцировки которых являются CD16 и CD56 [16]. Помимо этого, для оценки стадийности созревания клеток – выявления незрелых (Imm), зрелых 1 (M1) и зрелых 2 (M2) используют детекцию поверхностных CD11b- и CD27-антигенов [9]. Определяемые таким образом субпопуляции отличаются уровнем пролиферации и цитотоксичностью. Установлено, что на естественных клетках-киллерах экспрессия CD11b появляется, когда они приобретают свои полные эффекторные функции [8]. В таком случае NK-клетки теряют пролиферативный потенциал и продуцируют меньше цитокинов, становясь более цитотоксичными в отношении клеток-мишеней. Созревание NK-клеток является непрерывным процессом, который начинается с двойной отрицательной стадии CD27-CD11b-клетки (наиболее незрелая стадия) и заканчивается наиболее зрелыми клетками с фенотипом CD27-CD11b⁺ [11]. Большинство CD11b⁺ NK-клеток находятся в периферических органах, таких как селезенка, кровь, печень и легкие [5].

Одной из интересных областей для изучения полиморфизма NK-клеток является фтизиатрия, в связи с тем, что механизм длительного персистенции *M. tuberculosis* в организме человека до конца не изучен [15]. Помимо этого, появляется все большее число пациентов с коморбидной инфекцией, включающей вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, human immunodeficiency virus, HIV), что значительно осложняет течение заболевания [12, 13]. Изучение фенотипических особенностей клеток у больных туберкулезом легких может позволить выявить изменения популяционного состава клеток, сопровождающего бактериальную и смешанную бактериально-вирусную инфекцию [10].

Целью данного исследования стало определение некоторых субпопуляций NK-клеток у па-

циентов с туберкулемами легких при, а также в отсутствие синергичного инфицирования вирусом иммунодефицита человека.

Материалы и методы

В исследовании приняло участие 46 человек, сгруппированных в три когорты. В первую были включены 24 практически здоровых человека – 15 мужчин (62,5%) и 9 женщин (37,5%), средний возраст которых составил 37 лет (группа № 1), контрольная. Вторая объединила 12 больных с туберкулемами легких без клинических и лабораторных признаков наличия ВИЧ-инфекции – 8 мужчин (66,7%) и 4 женщины (33,3%), средний возраст которых составил 35 лет (группа № 2). Третья была представлена 10 больными с туберкулемами легких и инфицирована ВИЧ – 6 мужчин (60,0%) и 4 женщины (40,0%), средний возраст составил 39 лет (группа № 3). Во всех случаях диагноз A15.0 по МКБ (международной классификации болезней) был подтвержден клинико-инструментальными и лабораторными методами исследования. Возбудитель туберкулеза легких у всех пациентов был лекарственно-устойчивым. Среди больных туберкулезом не было потребителей наркотических средств, ²/₃ курили табачные изделия. Все больные ВИЧ-инфекцией имели 4 стадию заболевания. Добровольное информированное согласие на проведение исследования получено от всех участников испытания.

Иммунологическое исследование выполнялось методом проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter Epicx XL (Beckman Coulter, USA). Детектировали следующие популяции клеток: CD45⁺CD3⁺CD19⁻, CD45⁺CD3⁻CD19⁺, CD45⁺CD3⁻16⁺56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD45⁺CD3⁻CD8⁺, CD45⁺CD3⁻HLA-DR⁺, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD11b⁺ с использованием реагентов, производимых фирмой-изготовителем оборудования. Лизис эритроцитов осуществляли на станции пробоподготовки Coulter Q-Prep (Beckman Coulter, USA). Лейкоцитоз и лейкограмму определяли на клиническом анализаторе 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Poland). Кровь для исследования получали из периферической вены методом флеботомии в пробирку, содержащую антикоагулянт K₃EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота) из расчета 1,6 мг на каждый миллилитр биологической жидкости.

Полученные в результате исследования данные обрабатывали статистически. Предварительно оценивалась нормальность распределения показателей, для чего использовали ряд критериев: Шапиро–Уилка, Колмогорова–Смирнова, асимметрии и эксцесса, построения плоскостных, 2D,

а также нормальных вероятностных графиков. В качестве критериев оценки различий между сравниваемыми группами использованы Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (p_{k-w}) при уровне значимости различий $p < 0,017$ (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3), а также Wald-Wolfowitz test (p_{w-w}) при уровне значимости различий $p < 0,05$ (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3). Для установления зависимости между изученными лабораторными показателями и клиническими данными выполнялся факторный анализ. Исследования проведены в операционной среде Windows 10 (Microsoft Corp., USA), использована компьютерная программа Statistica v. 12.5 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение

Предварительное изучение полученных данных заключалось в оценке определения плотности функции распределения значений лабораторных тестов, что соответствовало получению ответа на вопрос: какому закону распределения подчиняются определенные в исследовании лабораторные показатели? Использование как минимум семи различных критериев позволило установить, что преимущественно, однако не во всех случаях, распределение не соответствовало функции Гаусса. Этот факт дал основание полагать, что для сравнения исследованных выборок могут быть использованы непараметрические критерии, в частности для оценки различий между тремя несвязанными группами № 1, № 2, № 3 Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, а для оценки различий между двумя несвязанными группами № 2 и № 3 Wald-Wolfowitz test.

Естественные киллеры, наряду с двумя другими основными популяциями клеток — Т- и В-лимфоцитами, — являются важными иммунокомпетентными клетками периферической крови человека. В процессе изучения пул этих клеток рассматривали с позиции репрезентативности в целом. В частности, определяя лейкоцитоз и соотношение основных популяций иммунокомпетентных клеток, установлено, что у больных с туберкулемами легких при наличии ВИЧ-инфекции 4-й стадии заболевания количество лейкоцитов периферической крови было на 22% меньше ($p_{k-w} < 0,016$), чем в группе здоровых людей (табл. 1).

Количество лимфоцитов в исследованных группах не имело значимых отличий. Вместе с тем, обратил на себя внимание факт более широкого распределения данных у больных туберкулезом, сопровождавшимся ВИЧ-инфекцией, что отражало высокую вариабельность значений данного теста у больных (рис. 1). Такой разброс

результатов отмечался как при исследовании относительных, так и абсолютных значений лимфоцитов периферической крови.

Исследуя непосредственно соотношение основных популяций клеток, на первый взгляд существенных отличий в объемах Т- и В-лимфоцитов в обследованных группах выявлено не было. Вместе с тем был обнаружен факт снижения количества НК-клеток у больных с туберкулемами легких как без ВИЧ-инфекции, так и в случае коморбидности с ВИЧ на 33,3% и в 3 раза ($p_{k-w} < 0,015$) соответственно, в сравнении со здоровыми людьми. Между группами больных туберкулезом при наличии и в отсутствие ВИЧ-инфекции также выявлялись различия, которые доходили до 2,2 раз ($p_{w-w} < 0,015$) — наименьшая популяция НК-клеток регистрировалась при инфицировании ВИЧ (рис. 2).

Изучая полученные данные (табл. 1), возникает вопрос: если из трех основных популяций иммунокомпетентных клеток — Т-лимфоцитов, В- и НК-клеток — численность последней группы снижается, соответственно, пул оставшихся двух популяций должен был увеличиваться? Таких значимых изменений выявлено не было, однако очевидным становится факт перераспределения клеток: возрастания на 3,2% относительного количества Т-лимфоцитов и на 33,2% — В-клеток. Эти данные могут косвенно свидетельствовать об участии и этих популяций в развитии патологического процесса, что найдет свое подтверждение ниже — в оценке полученных результатов методом факторного анализа.

В ходе исследования были рассмотрены некоторые популяции НК-клеток (табл. 2). В частности клетки, экспрессирующие α -цепь антигена CD8. Из ранее опубликованных данных известно, что примерно 30% НК-клеток периферической крови экспрессируют гомодимер CD8 α , такие клетки демонстрируют лучшую выживаемость при уничтожении клеток-мишеней [1]. В нашем исследовании у пациентов с туберкулемами легких существенных отличий в количестве таких клеток от популяции здоровых людей выявлено не было, при коморбидности бактериальной и вирусной инфекций количество CD45⁺CD3⁻CD8⁺-клеток было снижено более чем в 2,3 раза в сравнении с контрольной группой. Полученные данные согласуются со сведениями, полученными ранее, о значительном снижении популяции CD8⁺НК-клеток у нелеченых ВИЧ-инфицированных пациентов, которые коррелируют с вирусной нагрузкой и обратно пропорционально числу CD4⁺Т-клеток [2].

Данные о роли НКТ-клеток в контексте туберкулезной инфекции остаются спорными. Их описывают как подгруппу регуляторных Т-лим-

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), М

TABLE 1. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), M

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких в отсутствие ВИЧ (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2)	Больные с туберкулемами легких и ВИЧ (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV (No. 3)
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/l$	5,70 (4,85-6,10) 5,91	5,30 (4,60-6,25) 5,93	4,45 (3,55-5,40) 4,50 $p_{k-w} < 0,016$ (№ 1)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	32,75 (27,00-40,50) 34,33	32,30 (29,85-39,90) 33,63	35,25 (28,50-44,30) 37,55
Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/l$	1,92 (1,72-2,34) 2,06	1,80 (1,51-2,30) 1,87	1,95 (1,56-2,05) 1,66
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻	75,55 (69,30-82,93) 76,19	76,80 (69,60-81,00) 74,01	78,00 (74,48-83,35) 79,83
Т-лимфоциты, $10^9/л$ T-lymphocytes, $10^9/l$ CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻	1,60 (1,27-1,74) 1,58	1,31 (1,15-1,68) 1,38	1,60 (1,16-1,78) 1,35
В-клетки, % B-cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺	10,55 (9,35-13,75) 11,39	10,90 (7,55-16,45) 12,65	14,05 (9,83-18,63) 14,40
В-клетки, $10^9/л$ B-cells, $10^9/l$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD19 ⁺	0,23 (0,17-0,28) 0,24	0,20 (0,11-0,38) 0,24	0,19 (0,13-0,26) 0,21
НК-клетки, % NK-cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺	12,85 (7,23-16,23) 12,38	9,50 (7,30-13,90) 11,61	4,30 (2,78-5,80) 4,28 $p_{w-w} < 0,015$ (№ 2) $p_{k-w} < 0,006$ (№ 1) $p_{k-w} < 0,016$ (№ 2)
НК-клетки, $10^9/л$ NK-cells, $10^9/l$ CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺	0,24 (0,13-0,38) 0,26	0,16 (0,11-0,26) 0,22	0,08 (0,04-0,11) 0,08 $p_{w-w} < 0,036$ (№ 2) $p_{k-w} < 0,015$ (№ 1) $p_{k-w} < 0,016$ (№ 2)

Примечание. Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), М – медиана, межквартильный размах, среднее арифметическое величины. Уровень значимости: p_{k-w} (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) $p < 0,017$ (между тремя несвязанными группами № 1, № 2 и № 3); p_{w-w} (Wald–Wolfowitz test) $p < 0,05$ (между двумя несвязанными группами № 2 и № 3).

Note. Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), M, median, interquartile range, arithmetic mean. Significance level: p_{k-w} (Kruskal–Wallis one-way analysis of variance) $p < 0.017$ (between three unrelated groups No. 1, No. 2 and No. 3); p_{w-w} (Wald–Wolfowitz test) $p < 0.05$ (between two unrelated groups No. 2 and No. 3).

фоцитов, которые, как полагают, находятся под контролем вспомогательных клеток и растворимых факторов в локальной микроокружающей среде. Показано, что НКТ-клетки при инфекциях секретируют, с одной стороны, провоспалитель-

ные цитокины, которые стимулируют врожденные и адаптивные реакции, которые устраняют патогены, с другой стороны секретируют противовоспалительные цитокины, которые ограничивают увеличение очага [3]. В нашем исследо-

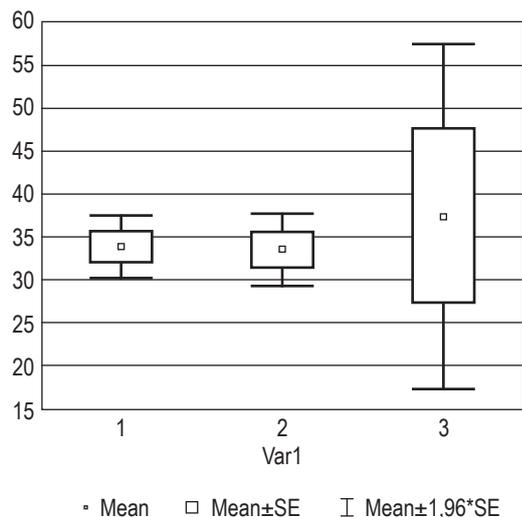


Рисунок 1. Относительное количество лимфоцитов у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. Mean – среднее арифметическое величин, SE – стандартная ошибка.

Figure 1. Relative number of lymphocytes in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. Mean, arithmetic mean; SE, standard error.

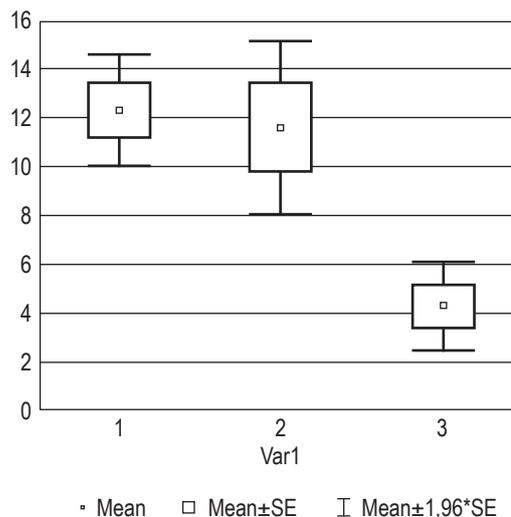


Рисунок 2. Относительное количество NK-клеток у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Relative number of NK-cells in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. As for Figure 1.

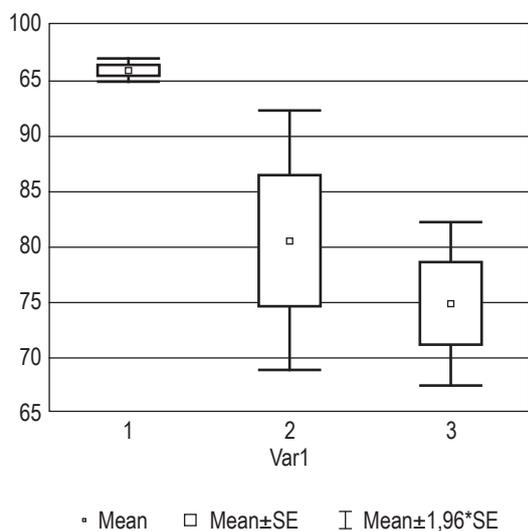


Рисунок 3. Относительное количество NK-клеток, экспрессирующих CD11b у здоровых людей (№ 1), больных с туберкулемами легких (№ 2), пациентов с туберкулемами легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией (№ 3)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Relative number of NK-cells, expressing CD11b in control group (No. 1), patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2), patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV-infection (No. 3)

Note. As for Figure 1.

вании было установлено, что наличие туберкулем легких сопровождалось двукратным снижением численности NKT-клеток ($p_{k-w} < 0,016$) в периферической крови больных, а при ко-инфекции с ВИЧ – шестикратным уменьшением популяции клеток ($p_{k-w} < 0,016$). К такому значительному снижению NKT-клеток в сосудистом русле может приводить их миграция в ткани – очаг воспалительного процесса. С другой стороны, такие изменения могут служить прогностическим признаком развития неблагоприятной ситуации.

HLA-DR – поверхностный рецептор, экспрессируемый клеткой при ее активации. Он может быть детектирован не только на Т-лимфоцитах, но и на В- и NK-клетках. Известно, что NK-клетки с фенотипом CD56^{bright} несут на своей поверхности HLA-DR. Полагают, что при туберкулезе эти клетки играют защитную роль, секретируя большие количества IFN γ [14]. Анализ результатов собственных исследований показал значимое снижение числа клеток с фенотипом CD45⁺CD3⁻HLA-DR⁺, представленным суммарно активированными В- и NK-клетками у больных с туберкулемами легких. Пул этих клеток был ниже, чем в контрольной группе на 34,3% ($p_{k-w} < 0,014$). При инфицировании больных туберкулезом ВИЧ, количество этих клеток составляло около половины от уровня, установленного

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), М

TABLE 2. STATISTICAL ANALYSIS DATA IN COMPARISON GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), M

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measure	Контрольная группа (№ 1) Control group (No. 1)	Больные с туберкулемами легких в отсутствие ВИЧ (№ 2) Patients with pulmonary tuberculous granulomas in the absence of HIV (No. 2)	Больные с туберкулемами легких и ВИЧ (№ 3) Patients with tuberculosis granulomas in the lungs and HIV (No. 3)
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % NK-cells, expression CD8, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,25 (1,50-6,00) 2,25	3,70 (1,80-4,65) 4,08	1,40 (0,95-1,95) 1,50 p _{w-w} < 0,040 (№ 2) p _{k-w} < 0,016 (№ 2)
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, 10 ⁹ /л NK-cells, expression CD8, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,07 (0,02-0,15) 0,07	0,06 (0,03-0,11) 0,08	0,03 (0,01-0,04) 0,03 p _{k-w} < 0,016 (№ 2)
НКТ-клетки, % NKT-lymphocytes, % CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	2,42 (1,41-4,23) 3,31	1,30 (0,70-3,00) 2,35	1,25 (0,60-2,13) 1,48
НКТ-клетки, 10 ⁹ /л NKT-lymphocytes, 10 ⁹ /l CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,06 (0,02-0,09) 0,06	0,03 (0,01-0,05) 0,05 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	0,01 (0,01-0,02) 0,02 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, % B-cells and activated natural killer cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	18,22 (16,11-20,38) 18,37	12,10 (9,10-15,30) 12,84	14,65 (10,63-18,78) 14,75
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, 10 ⁹ /л B-cells and activated natural killer cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,35 (0,32-0,41) 0,36	0,23 (0,15-0,32) 0,24 p _{k-w} < 0,014 (№ 1)	0,20 (0,14-0,28) 0,21 p _{k-w} < 0,012 (№ 1)
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK-cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	96,50 (92,75-100,00) 96,60	88,42 (79,86-84,25) 85,37 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)	78,72 (74,61-100,00) 86,96 p _{k-w} < 0,016 (№ 1)
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л NK-cells with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	0,23 (0,13-0,37) 0,25	0,18 (0,15-0,29) 0,23 p _{k-w} < 0,005 (№ 1)	0,10 (0,07-0,11) 0,09 p _{k-w} < 0,001 (№ 1) p _{w-w} < 0,040 (№ 2) p _{k-w} < 0,016 (№ 2)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

в группе здоровых людей (42,9 %, p_{k-w} < 0,012). Оценивая наличие CD3⁺HLA-DR⁺-клеток при инфицировании микобактериями необходимо понимать, что их присутствие облегчает контроль за возбудителем туберкулеза, поскольку раннее продуцирование IFNγ, вероятно, поддерживает численность вспомогательных клеток,

чувствительных к *M.tuberculosis*, и увеличивает цитотоксическую активность НК-клеток [3].

Интегрин CD11b (Mac-1) считается маркером зрелых NK-cell [7] и экспрессируется на подавляющем большинстве клеток, находящихся в периферическом русле. Проведенное исследование показало, что у больных с туберкулемами легких

ТАБЛИЦА 3. МАТРИЦА ФАКТОРНЫХ НАГРУЗОК
TABLE 3. MATRIX OF FACTORIAL LOADINGS

Показатель Indicator	Фактор I Factor I	Фактор II Factor II	Фактор III Factor III
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /l	-0,692601	-0,016862	-0,332315
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	0,001233	0,389706	-0,536727
Лимфоциты, 10 ⁹ /л Lymphocytes, 10 ⁹ /l	-0,590409	0,300114	-0,724699
В-клетки, % B-cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	-0,059131	-0,955135	-0,130208
В-клетки, 10 ⁹ /л B-cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	-0,390657	-0,682741	-0,538887
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻	0,688793	0,584885	-0,362093
Т-лимфоциты, 10 ⁹ /л T-lymphocytes, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻	-0,268868	0,473650	-0,803374
НК-клетки, % NK-cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺	-0,778766	0,110623	0,533208
НК-клетки, 10 ⁹ /л NK-cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁻ 16 ⁺ 56 ⁺	-0,951982	0,203563	0,121004
НКТ-клетки, % NKT-lymphocytes, % CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0,797594	0,024261	-0,012234
НКТ-клетки, 10 ⁹ /л NKT-lymphocytes, 10 ⁹ /l CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	-0,834970	0,111684	-0,104747
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % NK-cells, expression CD8, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	-0,580287	-0,124958	0,522045
НК-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, 10 ⁹ /л NK-cells, expression CD8, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	-0,796283	-0,018640	0,223660
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, % B-cells and activated natural killer cells, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	-0,035415	-0,935850	-0,123126
В-лимфоциты и активированные НК-клетки, 10 ⁹ /л B-cells and activated natural killer cells, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	-0,406350	-0,605307	-0,607777
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, % NK-cells with expression CD11b, % CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,862940	0,178066	0,224270
НК-клетки, экспрессирующие CD11b, 10 ⁹ /л NK-cells with expression CD11b, 10 ⁹ /l CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD11b ⁺	-0,928474	0,273506	-0,015371
Expl. Var.	7,121098	3,618500	3,075287
Prp. Totl.	0,418888	0,212853	0,180899

Примечание. Expl. Var. – дисперсия фактора, Prp. Totl. – доля дисперсии, приходящаяся на фактор.

Note. Expl. Var., the variance of the factor; Prp. Totl., the proportion of variance attributable to the factor.

количество CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток было снижено на 21,7% ($p_{k-w} < 0,005$) в сравнении с контрольной группой, а при коморбидной инфекции с ВИЧ таких клеток было в 2,3 раза меньше, чем в группе здоровых людей (рис. 3). Такое значимое снижение экспрессии, а значит, и эффекторных функций, не могло не отразиться на клинических проявлениях заболевания. О сходных изменениях в экспрессии CD11b у ВИЧ-инфицированных было заявлено в работе Milush J.M. и соавт. (2013), однако исследования не включали группы людей, больных туберкулезом.

Известно, что в ряде случаев непосредственное исследование лабораторных показателей не позволяет выявить изменения, характеризующие изучаемые патологические процессы. Это объясняется тем, что изменение каждого отдельного показателя возникает позже, чем нарушение корреляционных связей между несколькими из них. Своевременно обнаружить искажение корреляционных связей позволяет факторный анализ, который был использован в данной работе (табл. 3).

С учетом особенностей выполнения данного вида анализа: создания условий, при которых на каждый фактор приходилось бы не менее 1 лабораторного показателя — было выделено 3 наиболее значимых, определяющих особенности изученных патологических процессов. Первый фактор объединил 41,9% всей дисперсии и был представлен такими популяциями клеток как NK-, NKT-, NK-клетки, экспрессирующие α -цепь антигена CD8 и NK-клетки, экспрессирующие CD11b. Второй фактор объединил 21,3% всей дисперсии, его составили В-клетки, а также В-лимфоциты и NK-клетки, экспрессирующие HLA-DR⁺, что косвенно подтвердило факт участия В-лимфоцитов в патологическом процессе. Третий фактор объединил 18,1% дисперсии и был представлен общим количеством лимфоцитов, а также Т-клетками периферической крови. Все остальные изменения были обусловлены неучтенными факторами. Три значимых фактора объясняли 81,3% всей зафиксированной дисперсии. В целом, стандартизированная форма представ-

ления параметров в факторном анализе соответствовала степени их равнозначных связей с изученными процессами в объекте исследования.

Заключение

Поведенное исследование позволило установить, что туберкулемы легких сопровождаются снижением количества NK-клеток на 33%, двукратным понижением численности NKT-клеток, уменьшением на 34,3% популяции CD3⁺HLA-DR⁺ клеток, снижением на 21,7% количества CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток. Все описанные изменения установлены в сравнении со значениями, полученными в группе здоровых людей. Наличие ВИЧ-инфекции при туберкулемах легких ассоциировано с понижением количества лейкоцитов, значительной вариабельностью количества лимфоцитов, снижением числа NK-клеток в 3 раза, NK-клеток, экспрессирующих α -цепь антигена CD8 — в 2,3 раза, NKT-клеток — в 6 раз, CD3⁺HLA-DR⁺-клеток — на 42,9%, CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD11b⁺-клеток — в 2,3 раза.

Как у пациентов с туберкулемами легких, так и с наличием в структуре коморбидности ВИЧ-инфекции отмечено снижение контроля за инфекцией *M. tuberculosis*.

По результатам факторного анализа наибольшее значение в оценке больных с туберкулемами легких принадлежит слежению за численностью NK-, NKT-, NK-клеток, экспрессирующих CD11b, при коморбидности с ВИЧ-инфекцией — дополнительно за популяциями лимфоцитов, Т- и В-клеток.

Однако остается неясным вопрос: во время инфекции NKT-клетки усиливают провоспалительную реакцию на патогены или ингибируют ее, чтобы предотвратить развитие патологического процесса?

Благодарности

Автор выражает благодарность учреждению, на клинической базе которого было выполнено исследование: Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии — филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России.

Список литературы / References

1. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., Malayeri R., Wickremasinghe R.G., Davies J.K., Lowdell M.W. Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*, 2005, Vol. 116, pp. 354-361.
2. Ahmad F., Hong H.S., Jäckel M., Jablonka A., Lu I.N., Bhatnagar N., Eberhard J.M., Bollmann B.A., Ballmaier M., Zielinska-Skowronek M., Schmidt R.E., Meyer-Olson D. High frequencies of polyfunctional CD8⁺ NK Cells in Chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 21, pp. 12397-12408.

3. Barcelos W., Sathler-Avelar R., Martins-Filho O.A., Carvalho B.N., Guimarães T.M., Miranda S.S., Andrade H.M., Oliveira M.H., Toledo V.P. Natural killer cell subpopulations in putative resistant individuals and patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand. J. Immunol.*, 2008, Vol. 68, pp. 92-102.
4. Baumgarth N., Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Methods*, 2000, Vol. 243, no. 1-2, pp. 77-97.
5. Chiossone L., Chaix J., Fuseri N., Roth C., Vivier E., Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 22, pp. 5488-5496.
6. Flores-Montero J., Kalina T., Corral-Mateos A., Sanoja-Flores L., Pérez-Andrés M., Martín-Ayuso M., Sedek L., Rejlova K., Mayado A., Fernández P., van der Velden V., Bottcher S., van Dongen J.J.M., Orfao A. Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 2019, Vol. 475, 112618. doi: 10.1016/j.jim.2019.06.009.
7. Fu B., Tian Z., Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 2014, Vol. 141, no. 4, pp. 483-489.
8. Fu B., Wang F., Sun R., Ling B., Tian Z., Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*, 2011, Vol. 133, no. 3, pp. 350-359.
9. Goh W., Huntington N.D. Regulation of murine natural killer cell development. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 130. doi: 10.3389/fimmu.2017.00130.
10. Harris L.D., Khayumbi J., Ongalo J., Sasser L.E., Tonui J., Campbell A., Odhiambo F.H., Ouma S.G., Alter G., Gandhi N.R., Day C.L. Distinct human NK cell phenotypes and functional responses to *Mycobacterium tuberculosis* in adults from TB endemic and non-endemic regions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, Vol. 10, 120. doi: 10.3389/fcimb.2020.00120.
11. Isvoranu G., Surcel M., Huică R., Munteanu A.N., Pîrvu I.R., Ciotaru D., Constantin C., Bratu O., Neagu M., Ursaciuc C. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma - new dynamic biomarker. *Oncol. Lett.*, 2019, Vol. 17, no. 5, pp. 4197-4206.
12. Milush J.M., López-Vergès S., York V.A., Deeks S.G., Martin J.N., Hecht F.M., Lanier L.L., Nixon D.F. CD56^{neg} CD16⁺ NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology*, 2013, Vol. 10, 158. doi: 10.1186/1742-4690-10-158.
13. Pohlmeier C.W., Gonzalez V.D., Irrinki A., Ramirez R.N., Li L., Mulato A., Murry J.P., Arvey A., Hoh R., Deeks S.G., Kukulj G., Cihlar T., Pflanz S., Nolan G.P., Min-Oo G. Identification of NK cell subpopulations that differentiate HIV-infected subject cohorts with diverse levels of virus control. *J. Virol.*, 2019, Vol. 93, no. 7, e01790-18.
14. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
15. Venkatasubramanian S., Cheekatla S., Paidipally P., Tripathi D., Welch E., Tvinnereim A. R., Nurieva R., Vankayalapati R. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 10, pp. 1031-1042.
16. Zimmer J. CD56^{dim}CD16^{dim} Natural Killer (NK) cells: the forgotten population. *Hemasphere*, 2020, Vol. 4, no. 2, e348. doi: 10.1097/HS9.0000000000000348.

Автор:

Бердюгина О.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Author:

Berdyugina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 20.07.2021

Received 20.05.2021
Accepted 20.07.2021