

REACTIONS HAVE DIFFERENCES OF PHAGOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH DIFFERENT VOLUMES AFFECTED LUNG INFILTRATIVE TUBERCULOSIS

Berdyugina O. V.^{1,2}, Yershova A. V.¹

¹Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, ²Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

The purpose of research is the study of differences in the reactions of phagocytes of peripheral blood of patients with different lesion volume infiltrative pulmonary tuberculosis. The work was based on a study of the clinical and laboratory data of 44 patients with infiltrative pulmonary tuberculosis (29 patients were affected lung segment 1-3, 15 patients had tuberculosis 4 and lighter segments). The control group consisted of 25 healthy people. Used method – flow cytometry, Coulter®Epics®XL instrument (Beckman Coulter, USA). Evaluated absorbency peripheral blood phagocytes (monocytes and neutrophils), ability to oxidative exposure, the antigen-presenting and chemotactic functions. Statistical data analysis was performed using the «Microsoft Office Excel 2007» program and «Statistica For Windows v.6.1». It was found that the infiltrative tuberculosis 1-3 segments of the lung accompanied by an increase in the populations of monocytes and granulocytes which express the molecule CD11b adhesion. TB4 or more segments of the lung is associated with an increase in the number of monocytes and granulocytes expressing CD11c, decrease monocyte production of superoxide anion. Immunological evaluation of lung volume criterion is the percentage of monocytes, producing superoxide anion.

Key words: monocytes, neutrophils, CD11c, HLA-DR, tuberculosis

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД В ОЦЕНКЕ РЕАКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ПРИСУТСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С РАЗНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ

Бердюгина О. В.^{1,2}, Ершова А. В.¹

¹ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ; ²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Екатеринбург, Россия

Целью исследования стало сравнительное изучение количественного и функционального состояния клеток иммунной системы у больных инфильтративным туберкулезом легких, вызванным ЛЧ и лекарственно-устойчивыми возбудителями заболевания. В исследование включены 29 больных, из которых: у 12 человек заболевание было вызвано ЛЧ *M.tuberculosis*, у 17 – возбудитель имел МЛУ и 25 практически здоровых людей. Оценивали количество Т- (CD45⁺CD3⁺) и В-лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺), НК-клеток (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), γδ-Т-лимфоцитов (CD3^{bright}CD4⁻), NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов по экспрессии ими CD25 и HLA-DR, вероятность апоптоза по экспрессии CD95, число Т-reg-клеток (CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter®Epics®XL (Beckman Coulter, USA). Статистический анализ данных проведен с использованием программ Microsoft, USA (Office Excel 2007) и StatSoft, USA (Statistica For Windows v.6.1.). Установлено, что инфильтративный туберкулез, вызванный ЛЧ *M.tuberculosis*, сопровождается повышением экспрессии HLA-DR и снижением CD95 на Т-лимфоцитах, снижением количества В-клеток, увеличением числа НК-лимфоцитов. Инфильтративный туберкулез, вызванный *M.tuberculosis* с МЛУ, характеризуется отсутствием снижения CD95 на Т-лимфоцитах, уменьшением популяции NKT-клеток. Иммунологическим критерием оценки лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* является абсолютное количество CD3⁺HLA-DR⁺-клеток.

Ключевые слова: NKT-клетки, γδ-Т-лимфоциты, CD3⁺HLA-DR⁺, В-лимфоциты, туберкулез

Введение. Одним из факторов, формирующих условия для развития инфекционного заболевания является состояние иммунной системы, и прежде всего ее клеточного гомеостаза [1,2]. Кооперация иммунокомпетентных клеток определяет индивидуальные особенности патологического процесса, в том числе и реакцию организма на присутствие *M.tuberculosis* [3,4]. Увеличение в последнее время доли больных туберкулезом легких, вызванным возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), инициировало поиск факторов, способствующих этому [5].

Целью исследования стало сравнительное изучение количественного и функционального состояния клеток иммунной системы у больных инфильтративным туберкулезом легких, вызванным лекарственно-чувствительными (ЛЧ) и лекарственно-устойчивыми возбудителями заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 29 больных инфильтративным туберкулезом легких, из которых: у 12 человек заболевание было вызвано ЛЧ *M.tuberculosis*, у 17 – возбудитель имел МЛУ. Контрольная группа состояла из 25 обследованных. Изучение количественного и функционального состояния клеточного иммунитета проведено методом проточной цитофлуориметрии на приборе Coulter®Epics®XL (Beckman Coulter, USA). Оценивали количество Т- (CD45⁺CD3⁺) и В-лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺), NK-клеток (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺), $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов (CD3^{bright}CD4⁻), NKT-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), Т-reg-клеток (CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺), число активированных Т-лимфоцитов и Т-хелперов оценивали по экспрессии ими CD25 и HLA-DR, вероятность апоптоза по экспрессии CD95. Статистический анализ данных проведен с использованием программного обеспечения Microsoft (Office Excel 2007, USA) и StatSoft (Statistica For Windows v.6.1., USA).

Результаты. Субпопуляции лимфоцитов у больных с разной чувствительностью возбудителя заболевания к лекарствам характеризовались некоторым дисбалансом. Число В-лимфоцитов было существенно снижено у больных с ЛЧ изолятами *M.tuberculosis* – более чем на 30,0% и в абсолютном и в относительном выражении, в то время как у больных

с возбудителем заболевания с МЛУ количество В-клеток было равным показателям группы здоровых лиц. Небольшое (на 11,5% в сравнении с контролем) увеличение количества NK-клеток отмечалось у больных с туберкулезом, вызванном ЛЧ изолятами *M.tuberculosis*. В соотношении с больными, у которых туберкулез был вызван изолятами с МЛУ, отличие составляло уже 26,1%. Снижение абсолютного числа Т-хелперов было характерно для всех изученных больных, вместе с тем стоит отметить, что менее всего этому процессу были подвержены пациенты, заболевание которых было вызвано ЛЧ изолятами *M.tuberculosis*. Изменения в количестве Т-цитотоксических клеток были выраженными. Их популяция оказалась сниженной в группах с ЛЧ и лекарственно-устойчивыми *M.tuberculosis* на 13,6% в сравнении с контролем. Доля этих клеток от общего числа всех лимфоцитов у больных также была сокращена. Согласно полученным в исследовании данным, количество $\gamma\delta$ -Т-клеток было снижено у всех пациентов с инфильтративным туберкулезом легких. При изучаемом процессе с ЛЧ возбудителем снижение было наименьшим и составляло 18,2% в сравнении с контрольной группой. Наличие возбудителя с МЛУ сопровождалось снижением $\gamma\delta$ -Т-клеток в 1,9 раза. Относительное количество этих клеток также было понижено у всех больных; максимальное снижение наблюдалось у пациентов с МЛУ возбудителем заболевания и составляло 1,7 раза в сравнении с группой здоровых добровольцев. В целом стоит отметить, что наибольшее число этих клеток обнаруживалось в крови кластера больных с ЛЧ изолятами *M.tuberculosis* в сравнении с другими больными. В результате исследования было выявлено увеличение NKT-клеток у всех больных: абсолютное число NKT-клеток у пациентов с ЛЧ изолятами *M.tuberculosis* в 1,9 раза превышало значения этого показателя в контрольной группе, однако у больных, заболевание которых было вызвано изолятами *M.tuberculosis* с МЛУ он был увеличен лишь на 32,3%. Таким образом, при инфекции, вызванной ЛЧ возбудителем число NKT-клеток было на 45,1% больше, при МЛУ возбудителе.

Изучая функциональную активность клеток, было выяснено, что экспрессия маркеров ранней активации лимфоцитов CD25 на Т-лимфоцитах была незначительно повышена при инфильтративном туберкулезе, вызван-

ном ЛЧ возбудителем заболевания (на 5,6%). У пациентов с возбудителем заболевания, имеющим МЛУ, количество лимфоцитов, экспрессирующих этот маркер, было снижено в сравнении и с контрольной группой на 22,4%. Количество активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25^{high}) было незначительно увеличено у всех обследованных больных, однако только в случаях наличия ЛЧ возбудителя оно достоверно превосходило значения контрольной группы, повышаясь более чем в 1,5 раза. Исследование экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах показало разную направленность изменения: у больных с лекарственной чувствительностью выявлено увеличение значений на 28,9%, у пациентов с МЛУ возбудителем – снижение в 2,3 раза. Экспрессия маркера готовности к апоптозу – CD95 – на Т-лимфоцитах (CD3⁺CD95⁺) снижалась у больных с МЛУ-возбудителем на 20,5%, с ЛЧ – в 2,3 раза. Субпопуляция Т-хелперов, несущая маркеры готовности к апоптозу, (CD3⁺CD4⁺CD95⁺) снижалась у больных с ЛЧ возбудителем на 14,3% и увеличивалась на 14,3% при туберкулезе, вызванном МЛУ *M.tuberculosis*. Количество Т-рег-клеток было выше значений доноров у всех больных. В частности, у пациентов с МЛУ возбудителем количество Т-рег-клеток увеличивалось на 70%, а у пациентов в ЛЧ возбудителем – возрастало в 2 раза ($p < 0,05$).

Обсуждение. Выявленные различия позволяют говорить о том, что у больных, заболевание которых было вызвано ЛЧ изолятами *M.tuberculosis*, существует тенденция к сохранению функций Т-хелперов. Поскольку известно, что основной функцией Т-цитотоксических клеток является непосредственный контакт с поврежденными клетками и их разрушение, то снижение их количества в группах с ЛЧ и лекарственно-устойчивыми *M.tuberculosis* может свидетельствовать об их недостаточной защитной роли в осуществлении иммунного ответа организма. Изучение $\gamma\delta$ -Т-клеток началось сравнительно недавно, их роль в иммунных процессах остается до конца не выясненной, однако многие исследователи отводят этим клеткам весьма существенную роль в обеспечении резистентности организма к микроорганизмам, в частности, к *M.tuberculosis*. Согласно полученным в предоставленном исследовании данным, количество $\gamma\delta$ -Т-клеток было снижено у всех пациентов с инфильтративным туберкулезом. Однако, наибольшее

число этих клеток обнаруживалось в крови больных с ЛЧ изолятами *M.tuberculosis* в сравнении с другими больными. Последнее позволяет предположить, что при противостоянии ЛЧ изолятам *M.tuberculosis* небольшое снижение количества $\gamma\delta$ -Т-клеток не является критичным, с другой стороны можно заключить, что значимое понижение числа этих клеток у больного является одним из прогностических критериев заболевания его туберкулезом, вызываемым возбудителем с МЛУ. Именно этим подтверждаются сведения о соотношении числа $\gamma\delta$ -Т-клеток кластера пациентов с лекарственно устойчивыми изолятами к их количеству в кластере с ЛЧ изолятами в соотношении 1,9:2,9. НКТ-клетки являются одной из важных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, увеличение их количества в изученных группах позволяет говорить об их важной иммунорегуляторной роли в ответе на присутствие ЛЧ возбудителя заболевания. Экспрессия маркера готовности к апоптозу – CD95 – на Т-лимфоцитах свидетельствует об усилении апоптоза Т-лимфоцитов при наличии возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью, как способа защиты иммунной системы организма от патогена. Объективная картина, характеризующая субпопуляцию Т-хелперов, несущую маркеры готовности к апоптозу сходной с той, что описывается для Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD95⁺: апоптоз усиливается у больных при наличии лекарственно-устойчивого возбудителя.

В целом, при инфильтративном туберкулезе, вызванном ЛЧ изолятами *M.tuberculosis*, на Т-лимфоцитах наблюдается повышение экспрессии маркеров активации (CD25 и HLA-DR), снижение – маркеров готовности к апоптозу (CD95); обнаруживается наименьшее понижение числа Т-хелперов с увеличением на них экспрессии CD25 и снижением CD95 маркера; регистрируется повышение количества НК-, Т-НК-, Т-рег-, а также снижение В-клеток, сопровождается наименьшим снижением числа $\gamma\delta$ -Т клеток.

Инфильтративный туберкулез, вызванный изолятами *M.tuberculosis* с МЛУ, характеризуется снижением экспрессии CD25, HLA-DR и не CD95 на Т-лимфоцитах, понижением экспрессии CD95 на Т-хелперах, понижением количества НК-, НКТ- и $\gamma\delta$ -Т клеток.

Сравнительный анализ данных позволил установить критерий оценки лекарственной

чувствительности возбудителя туберкулеза – абсолютное количество CD3⁺HLA-DR⁺-клеток. При их количестве менее или равном 0,013x10⁹/литр с вероятностью 76,1% можно предполагать наличие возбудителя с МЛУ (диагностическая чувствительность – 74,3%, диагностическая специфичность – 84,4%), при величине равной или более 0,061x10⁹/литр с вероятностью 80,1% можно предполагать наличие лекарственно-чувствительного возбудителя (диагностическая чувствительность – 73,6%, диагностическая специфичность – 82,7%).

Выводы.

1. Инфильтративный туберкулез, вызванный ЛЧ *M.tuberculosis*, сопровождается повышением экспрессии HLA-DR и снижением CD95 на Т-лимфоцитах, снижением количества В-клеток, увеличением числа НК-лимфоцитов.

2. Инфильтративный туберкулез, вызванный *M.tuberculosis* с МЛУ, характеризуется отсутствием снижения CD95 на Т-лимфоцитах, уменьшением популяции NKT-клеток.

3. Иммунологическим критерием оценки лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*

является абсолютное количество CD3⁺HLA-DR⁺-клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Warren E., Teskey G., Venketaraman V. Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Journal of Clinical Medicine*, 2017. 6(2). 1-15.
2. Petruccioli E., Scriba T.J., Petrone L., Hatherill M., Cirillo D.M., et al. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur. Respir. J.*, 2016. 48(6). 1751-1763.
3. Jasenosky L.D., Scriba T.J., Hanekom W.A., Goldfeld A.E. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunol Rev*, 2015. 264. 74-87.
4. Moreira-Teixeira L., Redford P.S., Stavropoulos E., Ghilardi N., Maynard C.L., et al. T Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol*, 2017. 1601340.
5. Kalo D., Kant S., Srivastava K., Sharma A.K. Assess drug resistance pattern and genetic profile of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates by molecular typing methods using direct repeats and IS6110 in pulmonary tuberculosis cases. *Lung India*, 2017. 34. 155-159.

DIFFERENTIATED APPROACH IN EVALUATING THE RESPONSE OF IMMUNE SYSTEM TO THE PRESENCE OF *M.TUBERCULOSIS* WITH DIFFERENT DRUG SUSCEPTIBILITY

Berdugina O.V.^{1,2}, Ershova A.V.¹

¹Ural Research Institute of Phthisiopulmonology; ²Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

The purpose of the study has a comparative study of quantitative and functional state of the immune system cells in patients with infiltrative pulmonary tuberculosis, which is caused by drug-sensitive and drug-resistant disease. The study included 29 patients, of which: from 12 people the disease was caused by drug-sensitive *M.tuberculosis*, 17 – the causative agent had multidrug resistance and 25 healthy people. We estimated the number of T- (CD45⁺CD3⁺) and B-lymphocytes (CD45⁺CD19⁺), NK-cells (CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), T-helper cells (CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T cells (CD3⁺CD8⁺), $\gamma\delta$ -T-lymphocytes (CD3^{bright}CD4⁻), NKT-cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), activated T-lymphocytes and by the expression of T-helper cells of CD25 and HLA-DR, the probability of apoptosis of CD95 expression, the number of T-reg-cells (CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺) by flow cytometry on Coulter[®]Epics[®]XL instrument (Beckman Coulter, USA). Statistical data analysis was performed using Microsoft software, USA (Office Excel 2007) and StatSoft, USA (Statistica For Windows v.6.1.). Established that infiltrative tuberculosis caused by drug-sensitive *M.tuberculosis*, accompanied by an increase in HLA-DR expression and decrease in CD95 on T-lymphocytes, reducing the amount of B-cells, increased number of NK-cells. Infiltrative tuberculosis caused by *M.tuberculosis* multidrug resistance, is characterized by the absence of reducing CD95 on T-lymphocytes, a decrease in the population of NKT cells. Immunological criterion for evaluating drug sensitivity *M.tuberculosis* is the absolute quantity of CD3⁺HLA-DR⁺-cells.

Key words: NKT-cells, $\gamma\delta$ -T-lymphocytes, CD3⁺HLA-DR⁺, B-lymphocytes, tuberculosis