

На правах рукописи

Пантелеев Александр Владимирович

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА,
СПЕЦИФИЧНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К АНТИГЕНАМ МИКОБАКТЕРИЙ, У
БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Лядова Ирина Владимировна

Научный консультант:

кандидат медицинских наук

Багдасарян Татевик Рафиковна

Официальные оппоненты:

Балмасова Ирина Петровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний, Научно-исследовательский медико-стоматологический институт Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Хайдуков Сергей Валерьевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела «Химической биологии гликанов и липидов», Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Новикова Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Туберкулез (ТБ) является наиболее частой причиной смерти в мире от инфекционных заболеваний (WHO, 2016). В Российской Федерации проблема заболеваемости ТБ продолжает оставаться актуальной в связи с распространением ВИЧ инфекции и ТБ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью микобактерий (Нечаева О.Б., 2016). Для предупреждения распространения ТБ необходимы новые эффективные методы его профилактики, диагностики и лечения, к которым, в частности, относятся методы иммунопрофилактики, иммунодиагностики и хозяин-ориентированной иммунотерапии (Kiran D., 2016). Разработка таких подходов требует понимания иммунологических механизмов, обеспечивающих защиту от развития болезни и формирование протективного и патологического ответа в процессе заболевания.

По данным ВОЗ, микобактериями туберкулеза (*M. tuberculosis*, *Mtb*) инфицировано около трети населения Земли. Однако клинические проявления заболевания возникают только у 5-10% инфицированных людей (Хоменко А. Г., 1996). У остальной части популяции либо происходит полный клиренс патогена (Verrall A.J., 2014), либо устанавливается латентная туберкулезная инфекция (ЛТИ) - состояние иммунологической сенсбилизации в отсутствие клинических признаков и симптомов заболевания (Barry C.E., 2009). Наиболее часто ТБ поражает легкие. Заболевание характеризуется полиморфным течением и большой вариабельностью проявлений, включая вариабельность клинических форм, распространенности процесса в легочной ткани, наличием и степенью деструкции легочной ткани, наличием и степенью бактериовыделения. Изучению иммунного ответа, защищающего организм хозяина от развития болезни, посвящено большое количество исследований (Flynn J.L., 1993; Cooper A.M., 1997; Gallegos A.M., 2011; Sakai S., 2014). Напротив, клеточные и молекулярные механизмы, определяющие особенности течения заболевания, остаются мало изученными (Gonzalez-Juarrero M., 2009; Stern J.N.H., 2009). Существуют противоречия об относительной роли патологических иммунных реакций и недостаточности протективных факторов иммунитета в патогенезе заболевания, не ясно, зависит ли течение заболевания от количественных параметров ответа Т-хелперов 1 типа (Th1). Исследование зависимости между течением ТБ и особенностями иммунореактивности организма хозяина на ранних этапах развития заболевания является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Исследования протективного противотуберкулезного иммунного ответа продемонстрировали существенную роль в нем лимфоцитов Th1 (Cooper A.M., 1993; Flynn J.L., 1993). На модели экспериментальной туберкулезной инфекции было выявлено тяжелое течение инфекции у мышей-нокаутов по гену IFN- γ (MacMicking J.D., 1997; Cooper A.M., 2000) и рецептору к IFN- γ (Kamijo R., 1993). В исследованиях с участием людей было отмечено существенное возрастание риска развития микобактериальных инфекций при мутациях в гене рецептора к

IFN- γ (*IFNGR1*; Jouanguy E., 1999), рецептора к IL-12 (*IL-12Rbeta1*; Dorman S.E., 2000); генах, связанных с активностью IFN- γ : *ISG15* (Bogunovic D., 2012), *CYBB* (Bustamante J., 2011), *NEMO* (Dai Y.S., 2004), *IRF8* (Hambleton S., 2011; Lee W., 2011). Полученные данные об увеличении тяжести и риска развития ТБ в условиях дефицита Th1 привели к формированию концепции о ключевой роли лимфоцитов Th1 в протективном противотуберкулезном иммунитете (Flynn J.L., 1993; Jouanguy E., 1999).

Развитие тяжелой туберкулезной инфекции при выраженном дефиците ответа Th1/IFN- γ не означает зависимость патогенеза заболевания от интенсивности ответа Th1/IFN- γ . У основной части больных ТБ признаки выраженного иммунодефицита отсутствуют (Nikitina I.Yu., 2016). Вопрос о том, зависит ли эффективность противотуберкулезного иммунитета от количественных параметров ответа Th1/IFN- γ , остается неясным до настоящего времени. Проведенные в последнее время экспериментальные исследования показали отсутствие устойчивой корреляции между ответом Th1 и протекцией при *Mtb* инфекции. Так, было продемонстрировано, что протективная активность лимфоцитов CD4 не связана с их способностью продуцировать IFN- γ (Scanga C.A., 2000; Mittrücker H.-W., 2007). В некоторых исследованиях предположили, что механизм протективной активности IFN- γ связан не со стимуляцией антимикобактериальной активности макрофагов, как это принято считать (Ehlers S., 2003), а с подавлением патологического ответа лимфоцитов Th17 и нейтрофильного воспаления (Nandi B., 2011). Были получены данные о возможном вкладе Th1 в иммунопатогенез туберкулезной инфекции: у мышечнокауты по гену PD1 неконтролируемый ответ лимфоцитов CD4 приводил к тяжелой инфекции и быстрой гибели животных (Barber D.L., 2011), к таким же эффектам приводила повышенная продукция IFN- γ лимфоцитами CD4 (Sakai S., 2016). Эти результаты поднимают вопрос о роли количественных параметров ответа Th1 в протекции при ТБ и защите от этой инфекции.

При изучении роли иммунных реакций в противотуберкулезном иммунном ответе у людей одним из основных подходов является сравнение характеристик ответа у людей с ЛТИ и больных ТБ. В исследованиях, проведенных различными группами ученых, получены противоречивые сведения о преобладании лимфоцитов Th1, их субпопуляций и продуцируемых ими факторов при ЛТИ или активном ТБ. Так, по одним данным, содержание лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , и уровень IFN- γ в плазме крови выше у людей с ЛТИ (Hirsch C.S 1999; Hasan Z., 2009), по другим данным – у больных ТБ (Verbon A., 1999; Morosini M., 2003; Sahiratmadja E., 2007).

Одной из недавно описанных характеристик Т-клеточного иммунного ответа является способность клеток к одновременной продукции нескольких цитокинов. В частности, лимфоциты Th1 могут быть охарактеризованы по их способности к одновременной продукции TNF- α , IFN- γ и IL-2 (полифункциональные лимфоциты, ПФЛ) или только двух (бифункциональные лимфоциты, БФЛ) или одного из этих цитокинов (монофункциональные

лимфоциты, МФЛ). Исследования показали, что больные ТБ и люди с ЛТИ отличаются по преобладанию среди *Mtb*-реактивных лимфоцитов ПФЛ, БФЛ или МФЛ. Однако результаты исследований, проведенных разными авторами, противоречивы. По одним данным, преобладание ПФЛ характерно для ЛТИ и отражает протективные функции данных клеток (Day C.L., 2011; Harari A., 2011). Другие авторы сообщают о преобладании ПФЛ при ТБ и их относительном дефиците при ЛТИ (Sutherland J.S., 2009; Caccamo N. 2010). Таким образом, роль различных функциональных субпопуляций лимфоцитов Th1 в поддержании ЛТИ и иммунном ответе при ТБ остается до конца не ясной.

Малоизученным является вопрос о роли Th1/IFN- γ в определении особенностей течения ТБ. В литературе существует ограниченное число исследований, посвященных оценке взаимосвязи между иммунными реакциями и тяжестью ТБ (Абакаев О., 2015; Никитина И.Ю., 2013). В большей части работ тяжесть ТБ оценивается как интегративный показатель без рассмотрения отдельных патологических процессов, происходящих при развитии заболевания (деструкции легочной ткани, наличия и выраженности интоксикации и др.). Вместе с тем эти процессы могут быть опосредованы разными механизмами. Роль иммунологических механизмов в развитии отдельных проявлений ТБ до настоящего времени остается мало исследованной. Неизвестно, влияют ли количественные параметры ответа Th1/IFN- γ на такие процессы как диссеминация инфекции в легочной ткани, защита от деструкции легочной ткани и бактериовыделение. Для разработки новых методов профилактики и лечения ТБ понимание иммунологических механизмов, участвующих в процессе развития заболевания и определяющих особенности его течения и конкретные проявления патологии, имеет большое значение. Все вышесказанное определило цель настоящего исследования.

Цель исследования: анализ взаимосвязи между особенностями течения туберкулеза легких и количественными параметрами ответа Т-хелперов 1 типа и клеток врожденного иммунитета.

Задачи исследования:

1. Сравнить показатели антиген-специфичного ответа Т-хелперов 1 типа у больных туберкулезом легких и здоровых людей, не имевших или имевших контакт с больными туберкулезом.

2. Определить иммунологические параметры ответа Т-хелперов 1 типа, отличающие больных туберкулезом легких и здоровых людей, имевших контакт с больными туберкулезом.

3. Оценить степень дифференцировки и истощения субпопуляций Т-хелперов 1 типа, различающихся по способности к ко-продукции цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-2, у больных туберкулезом легких.

4. Проанализировать взаимосвязь между содержанием Т-хелперов 1 типа и особенностями течения инфекционного процесса у больных туберкулезом легких.

5. Проанализировать взаимосвязь между содержанием лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, их основных субпопуляций (клеток CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ и CD16/56⁺) и особенностями течения инфекционного процесса у больных туберкулезом.

6. Определить иммунологические маркеры тяжелого течения туберкулезного процесса.

Научная новизна

Впервые проведен детальный многопараметрический анализ взаимосвязи между отдельными проявлениями тяжести туберкулеза и реакциями клеточного иммунитета. Впервые показано, что у больных с впервые выявленным туберкулезом легких тяжесть заболевания не коррелирует с количественными параметрами антиген-специфичного ответа Т-хелперов 1 типа. Установлены основные иммунологические корреляты тяжелого течения туберкулеза: для деструкции легочной ткани и высокой степени бактериовыделения это высокое содержание в крови палочкоядерных нейтрофилов, для клинической тяжести заболевания – низкое содержание лимфоцитов. Впервые показано, что функциональные субпопуляции антиген-реактивных лимфоцитов Т-хелперов 1 типа, различающиеся по ко-продукции TNF- α , IFN- γ и IL-2, имеют разную степень дифференцировки (оцениваемую по отсутствию экспрессии CD27) и разный уровень экспрессии маркера истощения клеток PD1. Показано, что популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ (преобладающая у больных туберкулезом) содержит наибольший процент высокодифференцированных лимфоцитов CD27^{low/-} и наименьший процент клеток, экспрессирующих PD1. Впервые в рамках одного исследования проанализирована диагностическая ценность нескольких иммунологических способов дифференциации туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции, предложенных в последние годы и основанных на анализе антиген-реактивных лимфоцитов Т-хелперов 1 типа. Показано, что наиболее значимыми Т-клеточными маркерами активного туберкулеза, отличающими его от латентной туберкулезной инфекции, являются: высокий (более 0,2%) процент антиген-реактивных лимфоцитов TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ среди лимфоцитов CD4 и высокий (более 35%) процент эфффекторов CD27^{low/-} в популяции антиген-реактивных лимфоцитов CD4, детектируемых по продукции IFN- γ и TNF- α .

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы имеют фундаментальное значение и представляют практический интерес. Полученные в работе данные расширяют представление о иммунопатогенезе туберкулеза, показывают роль патологических реакций и «сдвигов», происходящих в популяциях нейтрофилов и лимфоцитов, в развитии туберкулеза и свидетельствуют о незначительной роли количественных параметров ответа Т-хелперов 1 типа в определении течения туберкулеза на ранних его этапах. В работе выявлены маркеры активности туберкулезной инфекции (процент клеток TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ среди лимфоцитов CD4; процент

клеток CD27^{low/-} среди антиген-реактивных лимфоцитов CD4, детектируемых по продукции TNF- α и IFN- γ), которые позволяют различать больных туберкулезом и людей с латентной туберкулезной инфекцией с чувствительностью 79% и специфичностью 72% и 78%, соответственно. Данные подходы могут иметь значение в клинической практике и позволить улучшить диагностику сложных случаев заболевания.

Методология исследования. Методология исследования спланирована соответственно со структурой и поставленными задачами. Объектом исследования являлись образцы периферической крови, полученные от больных ТБ легких, проходивших лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ», и от здоровых добровольцев, имеющих или не имеющих контакт с больными ТБ. В работе использованы современные иммунологические методы. Все исследования были одобрены этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ». Исследования были проведены в 2014-2017 годах, все участники добровольно подписали информированное согласие.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее значимыми Т-клеточными иммунологическими маркерами активного туберкулеза являются: высокий процент антиген-реактивных лимфоцитов TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ (более 0,2% от всех лимфоцитов CD4) и высокий процент эффекторов CD27^{low/-} в популяции антиген-реактивных лимфоцитов CD4, детектируемых по продукции IFN- γ и TNF- α (более 35%).

2. У больных с впервые выявленным туберкулезом легких среди различных популяций антиген-реактивных лимфоцитов CD4 преобладает популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻. По сравнению с другими популяциями, данная популяция характеризуется наибольшей степенью дифференцировки (более 63,8% [54,8%; 78,0%] клеток имеют фенотип CD27^{low/-}) и низким содержанием клеток, экспрессирующих маркер истощения PD-1 (20,1% [11,5%; 30,7%]).

3. У больных с впервые выявленным туберкулезом легких тяжесть различных проявлений заболевания не коррелирует с количественными параметрами антиген-специфичного ответа Т-хелперов 1.

4. У больных с впервые выявленным туберкулезом легких основным иммунологическим коррелятом деструкции легочной ткани является высокое содержание в крови палочкоядерных нейтрофилов; основным иммунологическим коррелятом клинической тяжести заболевания - низкое количество лимфоцитов.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ литературы, составлен план исследования, самостоятельно проведены и проанализированы все исследования методами проточной цитометрии и мультиплексного анализа. Постановка теста «QuantiFERON TB-Gold in-Tube» проводилась совместно с с.н.с. И.Ю. Никитиной. Автором самостоятельно проведена основная статистическая обработка результатов исследования; анализ в программе R-project выполнен

совместно с с.н.с. И.Ю. Никитиной. Выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы сформулированы автором самостоятельно.

Степень достоверности и апробация результатов

Апробация работы состоялась на научной конференции отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» (протокол №1 от 26 июня 2017 года). Основные положения диссертации были представлены на XV Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015), Научно-практических конференциях молодых ученых ФГБНУ «ЦНИИТ» (Москва, 2015, 2016, 2017), на IV European Congress of Immunology (Вена, Австрия, 2015), на симпозиуме «New Developments in Our Basic Understanding of Tuberculosis» (Ванкувер, Канада, 2017), «12 Форуме Кох-Мечников по туберкулезу» (Москва, 2017), на конференции «Systems Biology of Adaptive Immunity» (Аскона, Швейцария, 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 в рецензируемых научных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 110 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 4 глав с изложением результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 238 источников, из них 16 отечественных и 222 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 15 рисунками и 1 приложением.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Группы обследованных. В исследование включены 50 больных (21 мужчина, 29 женщин, возраст от 18 до 63 лет) с впервые выявленным, подтверждённым диагнозом ТБ легких и отрицательным результатом теста на ВИЧ инфекцию. В группе были представлены следующие клинические формы ТБ: туберкулема / множественная (4 человека), ТБ внутригрудных лимфатических узлов (1 человек), инфильтративный ТБ (27 человек), очаговый ТБ (5 человек), кавернозный ТБ (6 человек), диссеминированный ТБ (7 человек).

В исследование были также включены 39 добровольцев (8 мужчин, 31 женщина, возраст от 22 до 73 лет), работавших в тесном контакте с больными ТБ не менее одного года (от 1 до 30 лет, в среднем 5,7 лет) и не имевших клинических или рентгенологических признаков ТБ («контакты»).

Группа доноров была сформирована из 14 добровольцев (7 мужчин, 7 женщин, возраст от 23 до 55 лет), не имевших клинических или рентгенологических признаков ТБ и установленных контактов с больными ТБ («доноры»). Постановка теста «QuantiFERON®TB Gold In-Tube» («QFT», Cellestis Ltd, Австралия) показала, что у 9 людей из группы «контакты» и 2 людей из группы «доноры» результаты теста были положительными. «Контакты» и

доноры с положительными результатами теста «QFT» составили группу «люди с ЛТИ» в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Помимо многопараметрической характеристики лимфоцитов Th1 в работе также исследовали уровень антиген-специфической продукции IFN- γ клетками крови, который оценивали с помощью теста «QFT». В эту часть исследований были включены 88 больных ТБ (40 мужчин, 48 женщин, возраст от 18 до 76 лет), 50 доноров (30 мужчин, 20 женщин, возраст от 19 до 71 года) и 67 контактов (15 мужчин, 52 женщины, возраст от 23 до 73 лет).

Тест «QFT» был использован для: а) выявления ЛТИ у доноров и «контактов»; б) изучения зависимости между показателями тяжести ТБ и уровнем антиген-индуцированной продукции IFN- γ .

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и популяций лейкоцитов. У всех больных, включенных в исследование, определяли: а) содержание основных субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии, обрабатывая образцы периферической крови смесью мАт к антигенам CD45, CD3, CD4, CD8, CD16+CD56 и CD19 (все мАт - BD Biosciences, США); б) содержание лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов с помощью гематологического анализатора Ac-T diff (Beckman Coulter, США).

Анализ *Mtb*-реактивных лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , TNF- α и IL-2, степени их дифференцировки и истощения. Для идентификации *Mtb*-реактивных лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , TNF- α и IL-2, и определения степени их дифференцировки и истощения образцы крови стимулировали очищенным фильтратом культуры вирулентных *Mtb* (PPD, Accurate Chemical, США) в присутствии блокатора комплекса Гольджи («GolgiPlug», BD Bioscience). После окончания инкубации клетки обрабатывали мАт, специфичными к CD27, CD4, PD1 и CD8, пермеабелизовали раствором Perm2 (BD Biosciences) и обрабатывали мАт, специфичными к внутриклеточным цитокинам TNF- α , IFN- γ и IL-2. Клетки отмывали, фиксировали и анализировали на проточном цитометре.

Проточная цитометрия. Образцы клеток анализировали на проточном цитометре BD FACSCANTOII (BD Biosciences), данные компенсировали и анализировали в программе FlowJo (FlowJo inc., США).

Мультиплексный анализ. Мультиплексный анализ был использован для определения концентрации растворимого цитокина TNF- α в культуре клеток крови, стимулированных антигенами микобактерий (проба с антигенами *Mtb* из теста «QFT») и плазме крови. Подготовку образцов проводили по рекомендациям производителя, анализ проводили с помощью прибора Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали программы «MS Excel», Rstudio (www.rstudio.com, США) и «GraphPad» (GraphPad Software Inc., США). Для выявления различий между несколькими независимыми группами переменных использовали непараметрический тест Крускала-Уоллиса с использованием апостериорного

критерия Даннетта с поправкой на множественные сравнения Бенджамина-Хохберга (поправка FDR). Для установления и визуализации корреляционных связей между множественными параметрами использовали непараметрический тест по Спирмену и метод иерархической кластеризации, основанный на измерении расстояний между кластерами (в качестве расстояния использовали полученные методом Спирмена значения p -value). В работе было исследовано 53 иммунологических параметра: процент и абсолютное количество популяций *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4 Th1; концентрация IFN- γ в культуре клеток крови, стимулированных антигенами *Mtb*; концентрация TNF- α в плазме крови и культуре клеток; содержание лейкоцитов, процент и абсолютное количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и популяций лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, В- и NK-клеток). Для проверки не случайности полученных корреляционных связей применяли рандомизацию выборки с созданием 1000 псевдовыборок и в каждой из них проводили корреляционный анализ и кластеризацию (бутстрэппинг анализ). Чувствительность и специфичность иммунологических показателей определяли с помощью построения ROC-кривых с вычислением площади под ROC-кривой. Пороговые значения определяли, основываясь на максимальных значениях чувствительности и специфичности. Статистический анализ в программе Rstudio выполнен совместно с с.н.с. ФГБНУ «ЦНИИТ» И.Ю. Никитиной. Количественные показатели приведены в тексте как медиана с указанием квартилей.

Характеристика тяжести различных проявлений ТБ у больных, включенных в исследование

Основной целью работы являлся анализ взаимосвязи между состоянием клеточного иммунитета и течением ТБ, поэтому особое внимание было уделено характеристике и оценке тяжести ТБ. У всех больных определяли следующие показатели: клиническую форму ТБ, распространённость поражения легочной ткани («распространённость ТБ»), наличие и степень деструкции легочной ткани («степень деструкции»), наличие *Mtb*/ДНК и *Mtb* в мокроте («степень бактериовыделения»), клиническую тяжесть заболевания («клиническая тяжесть»). Описание распространённости ТБ, степени деструкции, клинических форм ТБ проводили сотрудники отделов фтизиатрии и лучевой диагностики ФГБНУ «ЦНИИТ» по результатам рентгенологических методов. Микробиологические и молекулярно-генетические исследования мокроты проводили сотрудники отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ». Клиническую тяжесть ТБ описывали сотрудники отдела фтизиатрии ФГБНУ «ЦНИИТ». Для количественной оценки каждого показателя была разработана система рангов, в которой каждому параметру присваивали численную оценку, характеризующую степень тяжести показателя (Таблица 1). Присвоение рангов проводили независимо автор работы и фтизиатр/микробиолог двойным слепым методом.

При наличии расхождений окончательный ранг определяли по результатам коллегиального обсуждения.

Таблица 1 - Система рангов, разработанная и использованная для оценки тяжести ТБ.

Показатель	Ранг	Количество пациентов		
Клинические формы туберкулеза				
Туберкулема / ТБ ВГЛУ	1	5		
Инфильтративный ТБ / Очаговый ТБ	2	32		
Кавернозный ТБ / Фиброзно-кавернозный ТБ	3	6		
Диссеминированный ТБ	4	7		
Распространенность ТБ: область легкого, пораженная туберкулезным процессом				
1-3 сегмента	1	18		
4 или больше сегментов или 1-2 целые доли	2	18		
3 доли в разных легких	3	10		
1 целое легкое или оба легких	4	4		
Степень деструкции: Количество и размер полостей распада (ПР*)				
ПР отсутствуют	1	21		
Одна мелкая ПР* (≤ 2 см в диаметре)	2	10		
Несколько мелких или 1 крупная (>2 см) ПР	3	16		
Несколько крупных ПР или система каверн	4	3		
Степень бактериовыделения - Наличие <i>Mtb</i> в мокроте				
Количество <i>Mtb</i> в мазках мокроты	Культуральный метод / ВАСТЕС	ПЦР		
0 или 1-2 <i>Mtb</i> в 30 полях зрения	0	0	1	9
0 или 1-2 <i>Mtb</i> в 30 полях зрения	0 или +	+	2	30
1-9 <i>Mtb</i> в 10 полях зрения	+	+ или НД**	3	1
1-9 <i>Mtb</i> в 1 поле зрения	+	+ или НД	4	7
≥ 10 <i>Mtb</i> в 1 поле зрения	+	+ или НД	5	3
Клиническая тяжесть заболевания				
Температура тела	Другие симптомы интоксикации (потливость, слабость и другие)			
Нормальная	-***	1	27	
Нормальная	+	2	14	
Субфебрильная	-	2	1	
Субфебрильная	+	3	7	
Фебрильная	+	4	1	

Примечание. * - ПР – полость распада, ** НД – нет данных, *** - признак отсутствует

Проведенный анализ показал, что для больных была характерна вариабельность проявлений ТБ. Более чем у половины всех больных тяжесть проявлений ТБ была невысокой (ранги тяжести 1 и 2), что можно объяснить включением в исследование больных с впервые выявленным ТБ. В то же время, у части больных, несмотря на недавнее начало заболевания, отмечали высокие показатели тяжести ТБ (ранги 3, 4 и 5): обширную распространенность ТБ,

высокую степень деструкции легочной ткани, тяжелое клиническое течение заболевания, высокую степень бактериовыделения (Таблица 1). Нами был проведен анализ взаимосвязи между тяжестью различных проявлений ТБ. Использовали корреляционный анализ по Спирмену с коррекцией на множественное тестирование (поправка FDR, порог значимости при $q=0.05$ составил $p=0.025$) и методом анализа иерархий. Анализ корреляций по Спирмену показал наличие значимой корреляции между: степенью деструкции и распространенностью ТБ; степенью деструкции и степенью бактериовыделения; распространенностью ТБ и степенью бактериовыделения.

Также была выявлена взаимосвязь между клиническими формами ТБ и распространенностью ТБ; клиническими формами ТБ и клинической тяжестью заболевания. В то же время, клиническая тяжесть ТБ не была взаимосвязана со степенью деструкции, степенью бактериовыделения и распространенностью ТБ (Таблица 2). Близкие результаты были получены при применении метода анализа иерархий. Данный анализ выявил два устойчивых кластера: кластер 1 (степень деструкции, степень бактериовыделения, распространенность ТБ) и кластер 2 (клинические формы ТБ и клиническая тяжесть ТБ, Рисунок 1). Полученные результаты указывали на то, что не все проявления ТБ связаны друг с другом, и позволяли предположить, что в основе различных проявлений ТБ могут лежать разные механизмы, в том числе иммунологические.

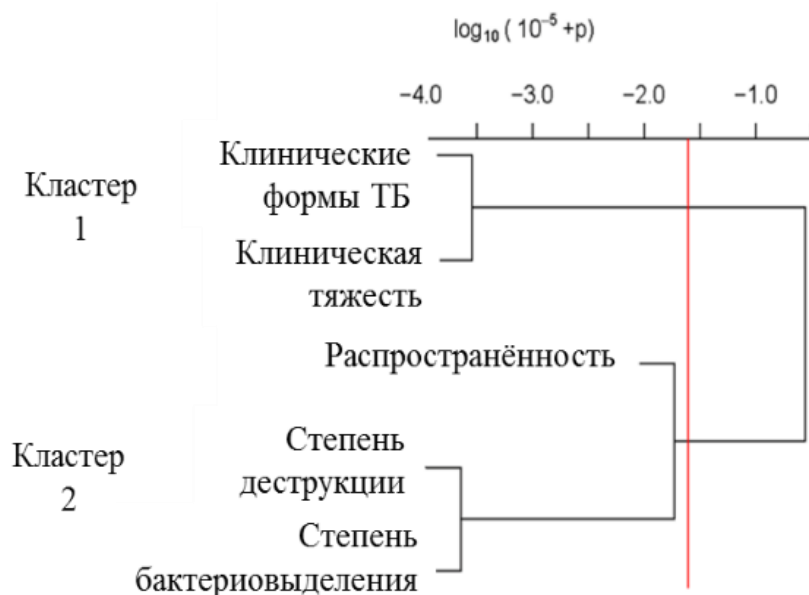


Рисунок 1 - Дерево иерархий

Примечание: Кластеризация данных выполнена в программе R с помощью процедуры *hclust*. Применение поправки FDR (уровень значимости $p=0.025$) привело к разделению показателей тяжести на два основных кластера

Таблица 2 - Корреляции между различными показателями тяжести туберкулезного процесса

Показатель	Степень бактериовыделения	Распространенность	Клиническая тяжесть	Клинические формы ТБ
Степень деструкции	$r=0.50, p=0.0002$	$r=0.33, p=0.018$	не достоверно	не достоверно
Степень бактериовыделения	1,000	$r=0.36, p=0.009$	не достоверно	не достоверно
Распространенность	$r=0.36, p=0.009$	1,000	не достоверно	$r=0.39, p=0.005$
Клиническая тяжесть	не достоверно	не достоверно	1,000	$r=0.49, p=0.0002$

Примечание: приведены результаты корреляционного анализа по Спирмену с поправкой FDR ($p=0.025, q=0,05$, проведен корреляционный анализ между пятью параметрами попарно)

Анализ субпопуляций *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, продуцирующих TNF- α , IFN- γ и IL-2

Исследования особенностей иммунного ответа у больных с разным течением ТБ были сфокусированы, главным образом, на анализе функциональной активности *Mtb*-реактивных лимфоцитов Th1. Первая часть иммунологических исследований была посвящена сравнению количественных параметров ответа лимфоцитов Th1 у больных ТБ и здоровых участников исследования. Для количественной характеристики лимфоцитов Th1 клетки крови стимулировали PPD и определяли процентное и абсолютное (в пересчете на мкл крови) содержание *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих IFN- γ (клетки IFN- γ ⁺), TNF- α (клетки TNF- α ⁺) и IL-2 (клетки IL-2⁺). Лимфоциты IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ и IL-2⁺ выявляли с помощью проточной цитометрии. Результаты, полученные у больных, сравнивали с результатами, полученными при анализе клеток здоровых участников исследования: контактов, доноров и людей с ЛТИ. У больных ТБ содержание лимфоцитов IFN- γ ⁺ и TNF- α ⁺ составляло от 0,14% до 2,75% от всех лимфоцитов CD4 и было достоверно выше, чем у контактов (Рисунок 2).

В отличие от лимфоцитов IFN- γ ⁺ и TNF- α ⁺, содержание лимфоцитов IL-2⁺ у больных ТБ, контактов, доноров и людей с ЛТИ достоверно не отличалось. Таким образом, у больных с впервые выявленным ТБ по сравнению со здоровыми участниками исследования, отмечали более высокое содержание *Mtb*-реактивных лимфоцитов-продуцентов IFN- γ и TNF- α , что свидетельствовало об отсутствии дефицита *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4 типа Th1 при ТБ, по крайней мере, на начальных стадиях заболевания.

Анализ субпопуляций лимфоцитов CD4, различающихся по ко-продукции цитокинов TNF- α , IFN- γ и IL-2

Одной из характеристик функциональных свойств лимфоцитов Th1 является их способность к одновременной продукции одного или нескольких цитокинов (Sutherland J.S., 2009). Для иммунологической характеристики

больных ТБ, включенных в исследование, мы исследовали содержание семи субпопуляций *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, отличающихся по ко-продукции цитокинов TNF- α , IFN- γ и IL-2.

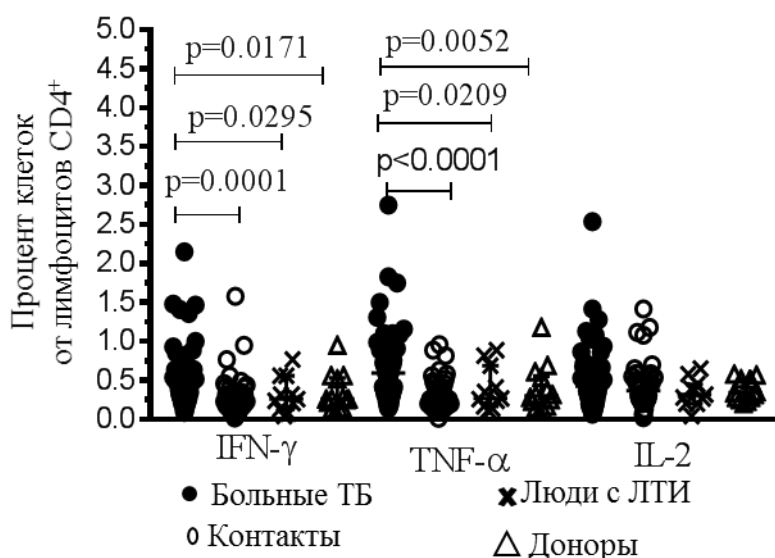


Рисунок 2 - Оценка содержания *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN- γ , TNF- α и IL-2

Примечание: процент клеток от лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN- γ , TNF- α или IL-2 (при $\alpha=0.05$ уровень значимости составил $p=0.0295$). Сравнение между группами было выполнено с помощью критерия Крускал-Уоллиса с поправкой FDR

Исследуемые субпопуляции включали: МФЛ (TNF- α^+ IFN- γ^- IL-2 $^-$, TNF- α^- IFN- γ^+ IL-2 $^-$ и TNF- α^- IFN- γ^- IL-2 $^+$), БФЛ (TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^+$, TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$ и TNF- α^- IFN- γ^+ IL-2 $^+$) и ПФЛ (TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^+$), далее - функциональные субпопуляции Th1. В литературе предложены два подхода для оценки содержания функциональных субпопуляций Th1: определение процента каждой из них от всех лимфоцитов CD4 («проценты ПФЛ», Рисунок 3.А) (Sutherland J.S., 2009) и определение процента каждой субпопуляции от всех *Mtb*-реактивных лимфоцитов («доля ПФЛ», Рисунок 3.Б) (Naragi A., 2011). Учитывая то, что противоречивость литературных данных о преобладании ПФЛ или МФЛ при ТБ или ЛТИ может быть обусловлена использованием разных способов определения функциональных субпопуляций Th1, в настоящей работе использовали оба подхода.

Проведенные исследования показали следующее. У больных ТБ был повышен: а) процент БФЛ TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$ (по сравнению со всеми здоровыми участниками исследования, $p<0.05$) и доля БФЛ TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$ (по сравнению с контактами и донорами); б) процент МФЛ TNF- α^+ IFN- γ^- IL-2 $^-$ (по сравнению с контактами) и процент МФЛ TNF- α^- IFN- γ^- IL-2 $^+$ (по сравнению с донорами, Рисунок 3.А, 3.Б). У больных ТБ были снижены: а) доля ПФЛ (по сравнению с донорами); б) доля БФЛ TNF- α^+ IFN- γ^- IL-2 $^+$ (по сравнению с контактами); в) доля БФЛ TNF- α^- IFN- γ^+ IL-2 $^+$ (по сравнению с донорами, Рисунок 3.Б). В целом, для больных ТБ было характерно смещение профиля продукции цитокинов от полифункционального, характеризующегося ко-продукцией трех

цитокинов, в сторону преобладания лимфоцитов, продуцирующих только TNF- α или TNF- α и IFN- γ (Рисунок 3.В).

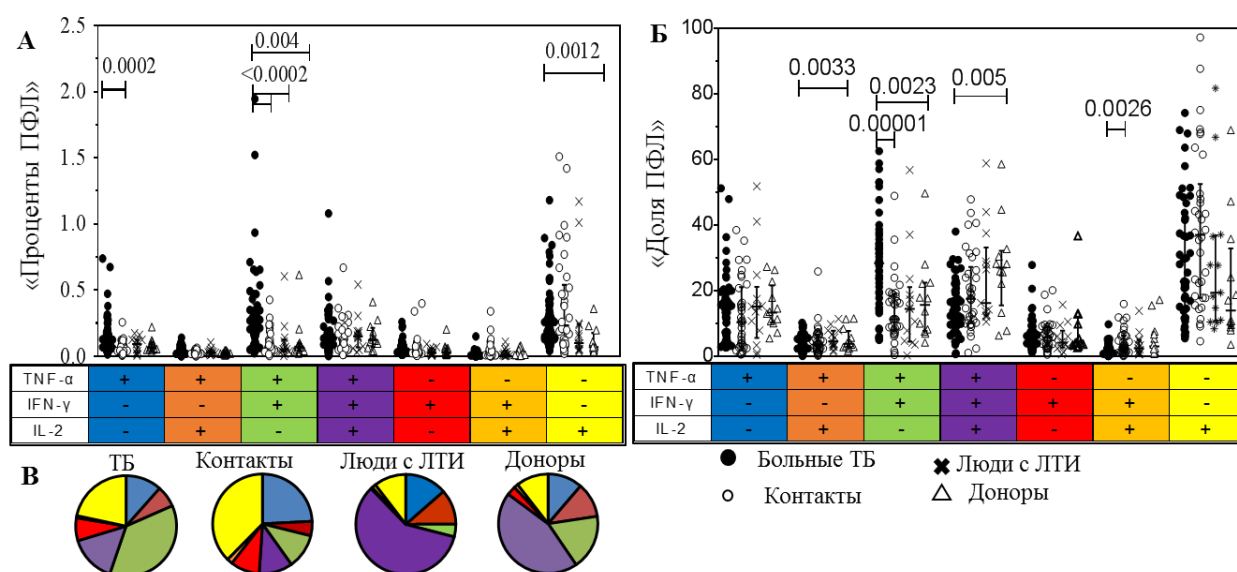


Рисунок 3 - Результаты определения содержания функциональных субпопуляций Th1

Примечание: А, процент каждой из 7 функциональных субпопуляций Th1 от всех лимфоцитов CD4; Б, доля каждой из 7 функциональных субпопуляций Th1 от всех *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4; В, круговая диаграмма, отражающая долю каждой из 7 функциональных субпопуляций Th1. Данные были проанализированы с использованием теста Крускал-Уоллиса с поправкой FDR (при $q=0.05$, уровень значимости составил $p=0,006$ (А), $p=0,0071$ (Б). Показаны только значимые различия.

Определение уровня антиген-индуцированной продукции IFN- γ и TNF- α

Для дальнейшей характеристики количественных параметров ответа Th1 у участников исследования был проведен анализ уровня антиген-индуцированной продукции IFN- γ и TNF- α клетками крови с использованием теста «QFT». Клетки крови стимулировали в соответствии с методикой производителя и определяли содержание в супернатантах стимулированных культур уровень продукции IFN- γ (тест «QFT») и TNF- α (мультиплексный анализ).

Проведенные исследования показали, что процент положительных результатов теста QFT у больных ТБ был выше, чем у контактов и доноров. У больных ТБ положительные результаты были зарегистрированы у 63 из 88 человек (72%), у контактов - у 23 из 67 участников (34%); у доноров - у 6 из 50 человек (12%). Уровень антиген-специфической продукции IFN- γ был достоверно выше у больных ТБ (1,79 [0,48;6,52] МЕ/мл), по сравнению с контактами (0,27 [0,08; 0,98] МЕ/мл, $p<0,001$) и донорами (0,13 [0,08;0,24]; МЕ/мл, $p<0,001$). Исследование уровня продукции TNF- α в антиген-индуцированных культурах не выявило достоверных различий между группами участников. Однако уровень спонтанной продукции TNF- α в плазме крови

больных ТБ был достоверно выше, чем у контактов (339,8 [164,3; 785,4] и 4,5 [2,0; 23,8] пг/мл, соответственно, $p < 0,0001$).

Таким образом, анализ содержания цитокин-продуцирующих *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, функциональных субпопуляций Th1 и уровня антиген-специфической и спонтанной продукции IFN- γ и TNF- α показал, что для больных ТБ было характерно: более высокое содержание лимфоцитов-продуцентов TNF- α и IFN- γ ; более высокое содержание МФЛ и БФЛ; более низкое содержание ПФЛ, более высокий уровень антиген-специфической продукции IFN- γ (в культуре клеток крови, стимулированных антигенами *Mtb* из теста «QFT»), более высокий уровень спонтанной продукции TNF- α в плазме крови.

Сравнительный анализ *Mtb*-специфичного ответа Т-лимфоцитов

Одной из актуальных задач иммунологии ТБ является определение активности ТБ и дифференциальной диагностики ТБ и ЛТИ. Для этого в последние годы было предложено несколько иммунологических подходов. Первый основан на определении степени дифференцировки *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4 по потере экспрессии CD27 (Streitz M., 2007; Nikitina I.Yu., 2012; Portevin D., 2014), второй связан с определением содержания различных функциональных субпопуляций Th1 (Cassamo N., 2010; Day C.L., 2011; Harari A., 2011). Было показано, что определение содержания лимфоцитов первым способом (оценка процента клеток, экспрессирующих фенотип CD27^{low/-} среди *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN- γ) позволяет отличать больных с активным ТБ и людей с ЛТИ с чувствительностью 67% и специфичностью 72%. Одним из ограничений такого подхода является низкое количество клеток, продуцирующих IFN- γ . В связи с этим, мы исследовали возможность идентификации *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4 на основе продукции не только IFN- γ , но и TNF- α . Было показано, что содержание CD27^{low/-} эффекторов CD4, продуцирующих IFN- γ , TNF- α или любого из этих цитокинов (клетки IFN- γ^+ TNF- α^+ , TNF- α IFN- γ^+ и TNF- α^+ IFN- γ^-), было выше у больных ТБ по сравнению со здоровыми участниками исследования ($p < 0,0005$).

Второй способ связан с определением содержания различных функциональных субпопуляций Th1 (Mueller H., 2008; Sutherland J.S., 2009; Cassamo N. 2010; Day C.L., 2011; Harari A., 2011). В настоящей работе мы сравнили чувствительность и специфичность описанных выше способов оценки активности ТБ. С этой целью у больных ТБ и контактов сравнивали следующие параметры: процент лимфоцитов CD27^{low/-} среди *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN- γ (1), TNF- α (2) и IFN- γ и TNF- α (клетки IFN- γ^+ TNF- α^+ , TNF- α IFN- γ^+ и TNF- α^+ IFN- γ^-) (3); проценты ПФЛ (4), доли ПФЛ (5, Таблица 3). Полученные результаты анализировали с построением ROC-кривых, определяя чувствительность и специфичность каждого подхода для идентификации активного ТБ. Было обнаружено, что наибольшей чувствительностью и специфичностью в выявлении активного ТБ при сравнении больных ТБ с контактами обладали способы определения содержания клеток

CD27^{low/-} среди *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4, детектируемых по продукции TNF- α и IFN- γ (3), и определения процентного содержания БФЛ TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ среди всех лимфоцитов CD4 (4) (Таблица 3).

Таблица 3 - Чувствительность и специфичность различных способов определения активности ТБ.

№	Иммунологический подход	Популяция клеток	р-значение	AUC	Чувствительность	Специфичность
(1)	Процент Лимфоцитов CD27 ^{-low}	IFN- γ ⁺	p=0,0021	0,698	61,5	72,1
(2)		TNF- α ⁺	p=0,0005	0,725	64,1	81,4
(3)		IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ , IFN- γ ⁺ TNF- α ⁻ , и IFN- γ ⁻ TNF- α ⁺	p<0,0001	0,812	79,5	78,0
(4)	Процент ПФЛ ⁺	TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺ IL-2 ⁻	p=0,0002	0,753	79,5	72,0
		TNF- α ⁺ IFN- γ ⁻ IL-2 ⁻	p=0,0002	0,682	89,7	44,0
(5)	Доля ПФЛ	TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺ IL-2 ⁺	p=0,0001	0,656	43,6	84,0

Анализ степени дифференцировки и истощения субпопуляций *Mtb*-реактивных лимфоцитов Th1 у больных ТБ легких

Полученные нами и рядом других авторов данные о преобладании МФЛ при активном ТБ, подняли вопрос о причинах, лежащих в основе различий функциональных свойств *Mtb*-реактивных лимфоцитов Th1 при ТБ. Известно, что инфекционный процесс и длительная стимуляция антиген-реактивных лимфоцитов антигеном вызывают их дифференцировку. Поэтому мы предположили, что наблюдаемое при ТБ смещение функционального профиля *Mtb*-реактивных лимфоцитов от поли- к монофункциональному может быть следствием изменения функциональной активности клеток по мере их дифференцировки. Для этого мы оценили степень дифференцировки (по отсутствию экспрессии CD27) и экспрессию PD1 функциональными субпопуляциями Th1.

Было обнаружено, что среди этих субпопуляций клетки, продуцирующие IL-2, были менее дифференцированы, чем соответствующие им популяции, не продуцирующие IL-2. Так, например, популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁻IL-2⁺ содержала меньше лимфоцитов CD27^{low/-}, чем популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁻IL-2⁻, популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ - меньше, чем популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁻IL-2⁻, популяция TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁺ - меньше, чем популяция TNF- α ⁻IFN- γ ⁻IL-2⁻ (Рисунок 4.А). Популяции, продуцирующие TNF- α , характеризовались большей степенью дифференцировки, чем аналогичные популяции, не продуцирующие TNF- α . Например, популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ содержала больше высокодифференцированных лимфоцитов CD27^{low/-}, чем популяция TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁺, популяция TNF- α ⁺IFN- γ ⁻IL-2⁺ - больше, чем TNF- α ⁻IFN- γ ⁻IL-2⁺, и TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻ - больше, чем TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁻ (Рисунок 4А). Таким образом, лимфоциты, преобладающие при ТБ (TNF- α ⁺IFN- γ ⁻IL-2⁻, TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻), характеризовались наибольшей степенью дифференцировки.

Важной характеристикой Т-лимфоцитов, отражающей их функциональный потенциал, является экспрессия на них рецептора PD1 (Freeman G.J., 2000). Нами была проанализирована экспрессия PD1 среди «функциональных субпопуляций Th1». Оказалось, что лимфоциты, продуцирующие IFN- γ в отсутствие продукции TNF- α (популяции TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁻ и TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁺), содержали наибольший процент клеток, экспрессирующих PD1 (Рисунок 4Б).

Таким образом, полученные нами данные связывают экспрессию PD1 с потерей продукции лимфоцитами TNF- α . В целом, лимфоциты TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻, преобладающие при ТБ, характеризовались наименьшим содержанием клеток, экспрессирующих PD1, и наибольшей степенью дифференцировки.

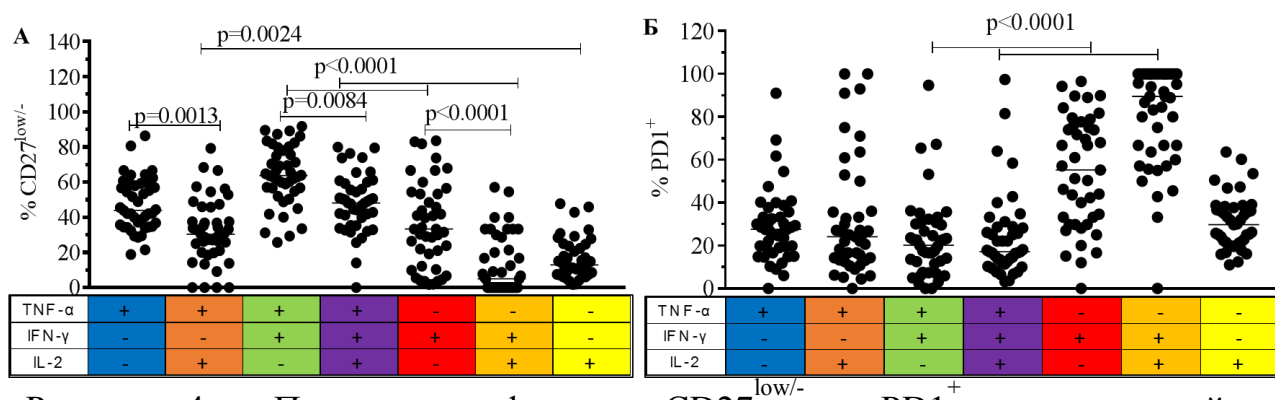


Рисунок 4 - Процент лимфоцитов CD27^{low/-} и PD1⁺ среди каждой из функциональных субпопуляций Th1

Примечание: А, процент лимфоцитов CD27^{low/-}; Б, процент лимфоцитов PD1⁺. Данные были проанализированы с использованием теста Крускал-Уоллиса с поправкой FDR (q=0.05), p=0,0132 (А), p=0.0196 (Б)

Анализ корреляции между функциональными субпопуляциями Th1 и тяжестью различных проявлений ТБ

Одной из задач работы явился анализ взаимосвязи показателей тяжести ТБ и количественных параметров ответа лимфоцитов Th1. Описанные выше результаты анализа содержания *Mtb*-реактивных лимфоцитов CD4 и их функциональных субпопуляций у больных ТБ выявили значительную вариабельность больных по анализируемым показателям. В связи с этим мы проанализировали, связана ли вариабельность в количественных показателях ответа Th1 с тяжестью ТБ. Анализ проводили путем определения корреляций по Спирмену с применением поправки FDR. Были выявлены только две достоверные корреляции: а) обратная корреляция между абсолютным количеством клеток TNF- α ⁻IFN- γ ⁺IL-2⁺ и степенью бактериовыделения ($r=-0.405$, $p=0.00324$); б) прямая корреляция между долей ПФЛ TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ и степенью деструкции ($r=0.369$, $p=0.0079$). При применении бутстрэппинг анализа данные корреляции становились незначимыми. Следует отметить, что тяжесть различных проявлений ТБ не коррелировала с содержанием клеток IFN-

γ^+ и $\text{TNF-}\alpha^+$. Таким образом, возникло предположение, что тяжесть ТБ не связана с количественными параметрами ответа Th1.

Анализ корреляций между уровнем антиген-индуцированной продукции IFN- γ , TNF- α и тяжестью различных проявлений ТБ

Для проверки предположения о том, что тяжесть ТБ не коррелировала с количественными параметрами ответа Th1, проанализировали наличие взаимосвязи между уровнем антиген-индуцированной продукции IFN- γ и TNF- α клетками крови больных ТБ и тяжестью различных проявлений ТБ (корреляционный анализ по Спирмену с поправкой FDR, $q=0.05$, $p=0,025$). Достоверной корреляции между тяжестью ТБ и уровнем антиген-индуцированной продукции IFN- γ или TNF- α выявлено не было. Были выявлены значимые обратные корреляции между митоген-индуцированной продукцией IFN- γ и: а) распространенностью ТБ ($r=-0.376$, $p=0.002$); б) клиническими формами ТБ ($r=-0.380$, $p=0.002$). Это свидетельствовало об антиген-специфической супрессии иммунного ответа при ТБ.

В целом, полученные результаты подтвердили сделанные выше предположения о том, что количественные параметры *Mtb*-специфичного ответа Th1 не являются фактором, определяющим тяжесть ТБ.

Анализ содержания основных популяций лимфоцитов в крови больных ТБ

Помимо анализа антиген-специфического ответа Th1, мы исследовали содержание у больных ТБ общих популяций иммунокомпетентных клеток – лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и их основных субпопуляций. Мы проанализировали субпопуляционный состав лимфоцитов с использованием проточной цитометрии и определили процентное и абсолютное содержание всех Т-лимфоцитов ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+$), лимфоцитов CD4 ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+$), CD8 ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD8}^+$), В-лимфоцитов ($\text{CD45}^+\text{CD3}^-\text{CD19}^+$) и NK-клеток ($\text{CD45}^+\text{CD3}^-\text{CD16}^+\text{CD56}^+$). Относительное и абсолютное содержание клеток у больных ТБ варьировало в широких пределах. Отклонения от нормы отмечали у 45 из 50 исследованных больных (90,0%). Наиболее часто наблюдали снижение абсолютного содержания лимфоцитов CD4, процентного и абсолютного содержания лимфоцитов CD8, В- и NK-клеток, а также увеличение процентного содержания лимфоцитов CD4. Несмотря на то, что ТБ у большинства больных сопровождался изменениями в субпопуляционном составе лимфоцитов, характер изменений и количество основных субпопуляций лимфоцитов не коррелировали с тяжестью ТБ.

Анализ содержания популяций лейкоцитов в крови больных ТБ

Кроме того, в работе был проведен анализ содержания основных популяций лейкоцитов у больных ТБ легких. Была выявлена значительная вариабельность больных по анализируемым показателям. У 38 больных (76% от всех исследованных больных) отмечались изменения одного или нескольких показателей. Наиболее характерными изменениями были: увеличение общего

количества лейкоцитов (20 больных, 40,0%), снижение процента лимфоцитов (14 больных, 28,0%), повышение процента палочкоядерных нейтрофилов (18 больных, 36%). С целью проверки гипотезы о существовании зависимости между наблюдаемыми отклонениями в содержании популяций лейкоцитов был проведен корреляционный анализ. Результаты корреляционного анализа показали, что количество лейкоцитов прямо коррелировало со степенью деструкции легочной ткани и степенью бактериовыделения; процент лимфоцитов обратно коррелировал со степенью деструкции легочной ткани, степенью бактериовыделения, распространенностью ТБ и клинической тяжестью ТБ; количество лимфоцитов обратно коррелировало с клинической тяжестью ТБ; процент сегментоядерных нейтрофилов прямо коррелировал со степенью деструкции легочной ткани; абсолютное количество сегментоядерных нейтрофилов - со степенью деструкции легочной ткани и степенью бактериовыделения; процент и абсолютное количество палочкоядерных нейтрофилов коррелировали со степенью деструкции легочной ткани и степенью бактериовыделения (Таблица 4). Содержание каждой из исследуемых популяций клеток коррелировало с различными проявлениями тяжести ТБ, поэтому далее проанализировали, какие из показателей тяжести ТБ являлись основными детерминантами. Анализ методом множественной линейной регрессии позволяет оценить вклад различных независимых переменных (степени деструкции, распространенности, степени бактериовыделения, клинической тяжести и клинических формы ТБ) в предсказание поведения непрерывной зависимой переменной (количества лейкоцитов; процента и количества лимфоцитов, сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов). Проведенный анализ позволил построить минимальные модели и показал следующее: процент сегментоядерных нейтрофилов зависел от распространенности и клинической тяжести; абсолютное количество сегментоядерных нейтрофилов - от деструкции и степени бактериовыделения; однако процент и абсолютное количество палочкоядерных нейтрофилов зависели только от степени деструкции легочной ткани.

В целом, основными иммунологическими параметрами, связанными с высокой степенью деструкции легочной ткани были высокое содержание палочкоядерных нейтрофилов и низкий процент лимфоцитов, а основным иммунологическим коррелятом клинической тяжести заболевания явилось низкое содержание лимфоцитов.

Таблица 4 - Корреляции между тяжестью туберкулезного процесса и содержанием основных популяций лейкоцитов в крови больных ТБ.

Показатель		Степень деструкции	Степень бактериовыделения	Распространенность ТБ	Клиническая тяжесть ТБ
Количество лейкоцитов		$r=0,442$, $p=0,00115$	$r=0,379$, $p=0,00621$	не достоверно	не достоверно
Лимфоциты	Процент	$r=-0,562$, $p=1,3 \times 10^{-5}$	$r=-0,504$, $p=0,00014$	$r=-0,510$, $p=0,00011$	$r=-0,447$, $p=0,00098$
	Количество	не достоверно.	не достоверно	не достоверно	$r=-0,449$, $p=0,00092$
Сегментоядерные нейтрофилы	Процент	$r=0,373$, $p=0,00725$	не достоверно	не достоверно	не достоверно
	Количество	$r=0,509$, $p=0,00012$	$r=0,433$, $p=0,0015$	не достоверно	не достоверно
Палочкоядерные нейтрофилы	Процент	$r=0,562$, $p=1,3 \times 10^{-5}$	$r=0,442$, $p=0,00113$	не достоверно	не достоверно
	Количество	$r=0,580$, $p=5,5 \times 10^{-6}$	$r=0,469$, $p=0,00048$	не достоверно	не достоверно

Примечание: Приведены результаты корреляционного анализа по Спирмену с поправкой FDR при $q=0.05$, $p=0.0097$

Выводы

1. Больные с впервые выявленным туберкулезом легких отличаются от здоровых людей, не имевших или имевших контакт с больными туберкулезом, более высоким процентным содержанием антиген-реактивных лимфоцитов CD4, продуцирующих IFN- γ , TNF- α , более высоким уровнем антиген-индуцированной продукции IFN- γ в тесте «QuantiFERON®TB Gold In-Tube», более высоким уровнем TNF- α в плазме крови.

2. У больных с впервые выявленным туберкулезом легких по сравнению со здоровыми людьми, имевшими контакт с больными туберкулезом, отмечается более высокое содержание бифункциональных лимфоцитов TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$ и монофункциональных лимфоцитов TNF- α^+ IFN- γ^- IL-2 $^-$.

3. Определение процента клеток TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$ среди лимфоцитов CD4 и процента клеток CD27^{low/-} среди антиген-реактивных лимфоцитов CD4 (детектируемых по продукции TNF- α и IFN- γ) позволяет дифференцировать больных активным туберкулезом и здоровых людей, имевших контакт с больными туберкулезом, с чувствительностью 79% в обоих случаях и специфичностью 72% и 78%, соответственно.

4. Антиген-реактивные лимфоциты CD4, отличающиеся по ко-продукции IFN- γ , TNF- α и IL-2, характеризуются разной степенью дифференцировки

(оцениваемой по содержанию лимфоцитов CD27^{low/-}) и разной экспрессией PD1: популяции, продуцирующие IL-2, имеют меньшую степень дифференцировки, а популяции, продуцирующие TNF- α , - большую степень дифференцировки и меньший процент клеток, экспрессирующих PD1.

5. Количественные параметры антиген-специфичного ответа Т-хелперов 1 типа не коррелируют с тяжестью различных проявлений туберкулеза.

6. Основным иммунологическим коррелятом деструкции легочной ткани и высокой степени бактериовыделения является высокое содержание в крови палочкоядерных нейтрофилов; основным иммунологическим коррелятом клинической тяжести туберкулеза является низкое содержание в крови лимфоцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение процента клеток CD27^{low/-} среди антиген-реактивных лимфоцитов CD4, детектируемых по продукции TNF- α и IFN- γ , и процента и доли бифункциональных лимфоцитов TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻, может быть использовано в качестве дополнительного метода для оценки активности туберкулеза.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одним из результатов работы является выявленная корреляция между высоким содержанием палочкоядерных нейтрофилов и деструкцией легочной ткани. Это ставит вопросы о механизмах, лежащих в основе выявленной взаимосвязи и приводящих к повышению содержания палочкоядерных нейтрофилов. Исследование этих закономерностей может позволить выявить фундаментальные особенности патогенеза туберкулеза. Продолжение исследований по разработке методов иммунологического определения активности туберкулеза сможет привести к созданию тест-систем, позволяющих проводить дифференциальную диагностику активного туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции с использованием доступного биологического материала - периферической крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Никитина, И.Ю. Накопление в крови высокодифференцированных *Mtb*-специфичных лимфоцитов CD4 у больных туберкулезом легких с деструкцией легочной ткани / И.Ю. Никитина, Н.А. Кондратюк, И.А. Васильева, Р.Б. Амансахедов, А.В. Пантелеев, И.В. Лядова // Туберкулез и болезни легких. - 2014. - Т. 91. - № 9. - С. 49-50.

2. Пантелеев, А.В. Определение содержания полифункциональных клеток у больных туберкулезом легких / А.В. Пантелеев, И.Ю. Никитина, И.А. Васильева, И.В. Лядова // Российский Иммунологический Журнал. - 2015. – Т. 9. - № 2. – С. 529-530.

3. Пантелеев, А.В. Валидация и модификация метода МТБ-27 для оценки активности туберкулезного процесса / А.В. Пантелеев, И. Ю. Никитина, Г.А.

Космиади, И.А. Васильева, И.В. Лядова // Медицинская иммунология. - 2015. – Т. 17. - № 3s. - С. 139.

4. **Пантелеев, А.В.** Иммунологическое профилирование больных туберкулезом легких выявляет их большую вариабельность / **А.В. Пантелеев**, И.Ю. Никитина // Материалы XV конференции «Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей», 25 марта 2016 - Москва, 2016. – С. 73-74.

5. **Пантелеев, А.В.** Сравнительный анализ функциональных субпопуляций Т-хелперов 1 типа и их степени дифференцировки у больных туберкулезом легких и людей с высоким риском латентной туберкулезной инфекции / **А.В. Пантелеев**, И.Ю. Никитина, Т.А. Ненашева, А.А. Николаев, И.В. Лядова // К 95-летию ФГБНУ «ЦНИИТ», Научные труды и очерки истории института. - Москва, 2016. - ООО «Галлея-принт». С. 408-416.

6. Никитина, И.Ю. Многопараметрический анализ иммунологических показателей, ассоциированных с тяжестью туберкулеза легких / Никитина И.Ю., **Пантелеев А.В.**, Ганусов В.В., Лядова И.В // Медицинская иммунология. – 2017. - Т. 19. - С. 142.

7. **Пантелеев, А.В.** Популяции лимфоцитов Th1, Th17 Th1/Th17 при туберкулезе легких. / **А.В. Пантелеев**, И.Ю. Никитина, Л.А. Горелова, Г.А. Космиади, И.В. Лядова // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – С. 142-143.

8. Патент 2576833 Российская Федерация, МПК G01N 33/49 (2006.01). Способ диагностики туберкулеза и дифференциальной диагностики туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции / Васильева И.А., Казанова А. С., Лядова И.В., **Пантелеев А.В.**, Тараканова Ю.Н., Кондратюк Н.А. Заявитель и патентообладатель: ФГБНУ "ЦНИИТ" (RU). - № 2014114430/15; заявл. 14.04.2014; опублик. : 10.03.2016, Бюл. № 7. 12с.

9. **Lyadova, I.V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers / I.V. Lyadova, A.V. Panteleev // Mediators Inflamm. - 2015. - Vol. 2015. - № 854507. – С. 1-13.**

10. **Carpenter, C. A side-by-side comparison of T cell reactivity to fifty-nine Mycobacterium tuberculosis antigens in diverse populations from five continents. / C. Carpenter, J. Sidney, R. Kolla, K. Nayak, H. Tomiyama, C. Tomiyama, O.A. Padilla, V. Rozot, S. F. Ahamed, C. Ponte, V. Rolla, P.R. Antas, A. Chandele, J. Kenneth, S. Laxmi, E. Makgotlho, V. Vanini, G. Ippolito, A.S. Kazanova, A.V. Panteleev, W.Hanekom, H. Mayanja-Kizza, D. Lewinsohn, M. Saito, M. J. McElrath, W. H. Boom, D. Goletti, R. Gilman, I. V. Lyadova, T.J. Scriba, E.G. Kallas, K. Murali-Krishna, A. Sette, C.S.L. Arlehamn // Tuberculosis (Edinb). 2015. - Vol. 95 - №.6. – С. 713-721.**

11. **Nikitina, I.Y. Antigen-Specific IFN-γ Responses Correlate with the Activity of M. tuberculosis Infection but Are Not Associated with the Severity of Tuberculosis Disease. / I.Y. Nikitina, A.V. Panteleev, E.V. Sosunova, N.L. Karpina, T.R. Bagdasarian, I.A. Burmistrova, S.N. Andreevskaya, L.N. Chernousova, I.A. Vasilyeva, I.V. Lyadova // J Immunol Res. – 2016. – Vol. 2016. - №7249369.**

12. Pantelev, A.V.. Severe Tuberculosis in Humans Correlates Best with Neutrophil Abundance and Lymphocyte Deficiency and Does Not Correlate with Antigen-Specific CD4 T-Cell Response. / A.V. Pantelev, I.Y. Nikitina, I.A. Burmistrova, G.A. Kosmiadi, T.V. Radaeva, R.B. Amansahedov, P.V. Sadikov, Y.V. Serdyuk, E.E. Larionova, T.R. Bagdasarian, L.N. Chernousova, V.V. Ganusov, I.V. Lyadova // *Front. Immunol.* – 2017. - Vol. 8. - № 963. –С. 1-16.

13. Nikitina, I.Y. Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3⁺CCR6⁺ Cells in the Blood and High- Differentiated CXCR3⁺CCR6⁻ Cells in the Lungs. / I. Y. Nikitina, A.V. Pantelev, G.A. Kosmiadi, Y.V. Serdyuk, T.A. Nenasheva, A.A. Nikolaev, L.A. Gorelova, T.V. Radaeva, Y.Y. Kiseleva, V.K. Bozhenko, I.V. Lyadova. // *J Immunol.* – 2018. - *ji1701424*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БФЛ – бифункциональные лимфоциты CD4	ТБ - туберкулез
ВГЛУ – внутригрудные лимфатические узлы	«QFT» – тест «QuantiFERON®TB Gold In-Tube»
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека	FDR - false discovery rate
ВОЗ, WHO – Всемирная Организация Здравоохранения	IFN- γ - интерферон гамма
ЛТИ - латентная туберкулезная инфекция	IL - интерлейкин
МАт – моноклональные антитела	<i>Mtb</i> - <i>M. tuberculosis</i> , микобактерии туберкулеза
МФЛ – монофункциональные лимфоциты CD4	PD1 - programmed cell death 1
ПФЛ – полифункциональные лимфоциты CD4	Th1 – лимфоциты CD4 Т-хелперы 1 типа
ПЦР - полимеразная цепная реакция	Th17– лимфоциты CD4 Т-хелперы 17 типа
	TNF- α - фактор некроза опухолей альфа