

УДК 579.873.21:615.281.873.21]-616-002.5

Характеристика Т- и В- лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя

Е.М. Скрыгина

Научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь

Characteristics of T- and B- lymphocytes in patients with multidrug resistant tuberculosis

A.M. Skrahina

Research Institute of Pulmonology and Tuberculosis, Minsk, Belarus

Аннотация

Изучена динамика показателей иммунного статуса (иммунофенотипирование лейкоцитов периферической крови с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии, определение содержания сывороточных иммуноглобулинов) у 98 больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) в процессе проведения химиотерапии: при установлении диагноза МЛУ, через 3 и 6 мес. лечения.

Установлено, что в процессе эффективного лечения больных туберкулезом с МЛУ абсолютное количество лимфоцитов и CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток увеличивается практически до нормальных показателей. В группе больных туберкулезом с МЛУ с прогрессированием процесса, несмотря на лечение, эти показатели остаются по-прежнему на низком уровне, так же как и содержание В-лимфоцитов (CD19⁺) в группе больных с отрицательной динамикой в процессе лечения.

Выявленные изменения показателей иммунного статуса в ходе лечения больных туберкулезом с МЛУ могут являться прогностическими факторами, свидетельствующими о достаточности и адекватности химиотерапии с учетом чувствительности к противотуберкулезным препаратам, а также дополнительным показанием для коррекции или усиления проводимой химиотерапии.

Ключевые слова

Туберкулез, иммунитет, лимфоциты, лекарственная устойчивость.

Summary

Characteristics of T- and B-lymphocytes were studied using flow cytometry in three and six months of chemotherapy in 98 MDR TB patients.

In patients with good treatment a response increase up to normal values in absolute lymphocyte count, absolute number of CD3⁺/CD4⁺ cells and CD3⁺/CD8⁺ cells was observed ($P < 0,001$). In patients with TB progress despite the treatment all the above parameters as well as CD19⁺ cells remained at a low level.

Revealed characteristics of T- and B- lymphocytes during chemotherapy showing the adequacy of treatment may have a prognostic value and also resistance can be additional hints to strengthening chemotherapy.

Key words

Immune status, multidrug resistant, tuberculosis

Рост частоты множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) возбудителя туберкулеза в Республике Беларусь является одной из причин напряженной эпидемической ситуации. Одним из факторов, затрудняющих проведение полноценного лечения, является наличие у таких больных нарушений иммунного статуса [1, 2]. Контроль за распространением *M. tuberculosis* осуществляется с вовлечением широкого спектра иммунокомпетентных клеток и секретируемых ими медиаторов. Правильное понимание иммунологии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью является важным аспектом в разработке новых эффективных методов лечения и профилактики данной формы заболевания.

Иммунный ответ против микобактерий туберкулеза включает в основном Т-лимфоцитарную активацию макрофагов и высвобождение макрофагами интерферона- (ИФН- γ). Это ведет к формированию гранулемы и ограничению распространения микобактерий. Макрофаги и дендритные клетки находятся в центре таких гранул вместе с микобактериями, окруженные Т-лимфоцитами, которые обеспечивают их активацию. Прайминг наивных Т-лимфоцитов против микобактериальных антигенов происходит в проксимальных отделах лимфатических узлов и возлагается на дендритные клетки. После прайминга в лимфатических узлах CD4⁺ и CD8⁺ клетки памяти становятся центральным компонентом приобретенного иммунитета. В прайминге наивных Т-клеток принимают участие ИЛ-1, ИЛ-6, фактор некроза опухоли - α (ФНО- α). Способность CD4⁺ и CD8⁺ клеток убивать внутриклеточных возбудителей зависит от их возможности контактировать с инфицированными клетками и секретировать молекулы, обладающие цитолитическим и антимикробным эффектом [3]. Выраженный прямой цитотоксический эффект CD8⁺ Т-клеток в отношении инфицированных клеток и самих микобактерий туберкулеза подтвержден рядом экспериментальных работ [4, 5].

Роль CD4⁺ клеток в процессах иммунитета опосредуется через секрецию различных цитокинов. CD4⁺ клетки в результате распознавания антигена дифференцируются в субпопуляции Th1 и Th2, вырабатывающие две различные группы цитокинов: Th1 – ИЛ-2, ИЛ-12, γ -ИФН, а Th2 – ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10. Оба клон клеток продуцируют ИЛ-3, ГМ-КСФ, Г-КСФ, ФНО- α . [6, 7].

CD4⁺ клетки ко-экспрессирующие CD25 антиген у человека были описаны как клетки иммунной анергии в ответ на поликлональное воздействие. Эти, так называемые, регуляторные CD4⁺ клетки характеризуются способностью угнетать продукцию цитокинов, особенно ИФН- γ и ингибировать активность CD4⁺ клеток посредством механизма клеточно-клеточного контакта [5, 8, 9]. У человека только эти клетки обладают указанной способностью [10].

Гуморальным факторам иммунитета в настоящее время придается иное значение, чем ранее. Доказано усиление ингибиторного эффекта нейтрофилов и моноцитов/макрофагов на рост микобактерий БЦЖ индуцированными антителами. БЦЖ индуцированные антитела повышали пролиферацию Т-клеток и увеличивали продукцию ИФН- γ [11].

Целью исследования явилось изучение содержания Т-, В-лейкоцитов и иммуноглобулинов периферической крови в процессе химиотерапии больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 98 больных с установленным диагнозом туберкулеза с МЛУ. У 36 из них данный диагноз туберкулеза легких был установлен впервые. Эти больные рассматривались как не получавшие лечение ранее. У остальных больных ($n=62$) устойчивость выделяемых микобактерий к противотуберкулезным препаратам (ПТП) была приобретена в процессе лечения. Однако и у этих больных множественная лекарственная устойчивость выделяемых микобактерий к ПТП была установлена также впервые. Характеристика больных, вошедших в данное исследование, представлена в табл. 1.

Исследование показателей иммунитета проводили сразу после выявления МЛУ у выделяемых микобактерий. В дальнейшем показатели исследовали в процессе лечения, через 3 и через 6 месяцев.

После 6 месяцев лечения вошедшие в исследование больные были разделены на пять групп в соответствии с результатами лечения. У больных 1-й группы отмечалась конверсия мокроты (по данным последних двух ежемесячных посевов), сопровождающаяся положительной рентгенологической динамикой либо отсутствием отрицательной рентгенологической динамики ($n=30$). Больные 2-й группы характеризовались продолжением бактериовыделения и

Таблица 1

Результаты исследования динамики иммунологических показателей в процессе лечения больных туберкулезом с МЛУ

Параметры	Количество, чел.
Предшествующее лечение	
Не получали	36
Получали менее 12 мес.	35
Получали более 12 мес.	27
Получали препараты первого ряда	29
Получали препараты второго ряда	33
Характер устойчивости микобактерий к ПТП	
HR(±S)	17
HRE(±S)	13
HRZ(±S)	13
HREZ(±S)	11
HR(±S±E±Z)Km/Am	15
HR(±S±E±Z)Eto/Pto	13
HR(±S±E±Z)Cfx/Ofz	8
HR(±S±E±Z) Km/Am Eto/Pto	4
HR(±S±E±Z) Km/Am Cfx/Ofz	4
Распространенность поражения на момент установления МЛУ	
Одна доля	21
Более одной доли	42
Двухсторонний процесс	35
Поражение плевры	21

Примечание. Обследовано 32 мужчин, 56 женщин. Средний возраст – 38 лет. Медиана – 38 (min – 20, max – 58).

отрицательной рентгенологической динамикой ($n=25$). У больных 3-й группы наблюдалась конверсия мокроты, сопровождающаяся отрицательной рентгенологической динамикой ($n=18$). Больные 4-й группы характеризовались продолжением бактериовыделения с отсутствием отрицательной рентгенологической динамики ($n=16$). Больные 5-й группы

прервали лечение ($n=9$). Последующие анализ и сравнения были проведены в 1-й и во 2-й группах как наиболее показательных.

Иммунофенотипический анализ лейкоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии, FACS-can (Becton Dickinson), с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD4-PE, HLA-DR-PE, CD25PE, CD3-FITC, CD56-PE, CD19-PE и изотипических контролей IgG1-FITC и IgG2-PE (Becton Dickinson, США). Абсолютное количество лимфоцитов и их субпопуляций в крови определяли на основании показателей стандартного общего анализа периферической крови. Иммунофенотипический и общий анализы

крови проводили из одного и того же образца забранной периферической венозной крови. Состояние гуморального иммунитета больных туберкулезом с МЛУ в процессе лечения оценивали по относительному и абсолютному количеству В-лимфоцитов, а также по содержанию иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG в периферической крови.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Для сравнения двух групп независимых данных использовали *U*-тест Манна-Уитни, для сопоставления трех и более – метод рангового анализа вариаций по Краскелу-Уоллису, при получении $p<0,05$ в дальнейшем проводили парное сравнение между группами, используя *U*-тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Сравнение двух групп зависимых данных осуществляли с помощью парного теста Уилкоксона.

Положительная динамика в процессе лечения сопровождалась достоверным ростом абсолютного количества лимфоцитов периферичес-

кой крови. В то же время прогрессирование патологического процесса на фоне лечения характеризовалось персистирующей лимфопенией. Абсолютное содержание лимфоцитов крови имело статистически значимое различие в указанных группах как после 3, так и после 6 месяцев лечения. Содержание $CD3^+CD4^+$ клеток в периферической крови в процессе эффективного лечения повышалось и достигало уровня таковых в контрольной группе. В группе больных, у которых лечение оказалось неэффективным, количество этих клеток оставалось низким как по сравнению с группой контроля, так и по сравнению с группой больных с положительной динамикой в ходе лечения. Количество $CD3^+CD8^+$ клеток в периферической крови в период лечения МЛУ туберкулеза с положительной динамикой процесса также повышалось, достигая уровня таковых в контрольной группе. В группе больных МЛУ туберкулезом с отрицательной динамикой количество этих клеток не изменялось и оставалось низким.

Статистически значимых колебаний в количестве $CD4^+HLA-DR^+$, $CD8^+HLA-DR^+$ и $CD4^+CD25^+$ клеток, ни у больных с положительной динамикой процесса, ни и у больных с прогрессированием МЛУ туберкулеза не было выявлено. Эти показатели также не отличались между собой при сравнении между группами и при сравнении групп больных с контрольной группой.

Обобщенные данные показателей гуморального иммунитета больных туберкулезом с МЛУ, у которых в процессе лечения наблюдалась или отсутствовала положительная динамика, представлены соответственно в табл. 4, 5. Статистически значимых колебаний в уровне фракций иммуноглобулинов в крови больных МЛУ туберкулезом не отмечалось. Различий в концентрации иммуноглобулинов в процессе лечения по сравнению с показателями в контрольной группе выявлено не было. При сравнении групп больных между собой различий соответствующих показателей на разных этапах лечения также не было найдено. При сравнении показателя процентного содержания В-лимфоцитов ($CD19^+$) от общего количества лимфоцитов периферической крови на каждом из этапов лечения различий между группами больных и между группами больных и контрольной группой не было выявлено. Сниженное в момент установления диагноза МЛУ абсолютное количество В-лимфоцитов периферической крови у больных МЛУ туберкулезом,

имевших положительную динамику, в процессе лечения повышалось и уже к 3 месяцу лечения не отличалось от показателя в контрольной группе. Этот же показатель в группе больных с отрицательной динамикой в процессе лечения оставался на изначально низком уровне и его значение после 3 и 6 месяцев лечения было статистически достоверно ниже по сравнению с таковым в контроле и в группе с положительной динамикой процесса.

Результаты и обсуждения

Показатели клеточного иммунитета больных туберкулезом легких с МЛУ, у которых в течение 6 месяцев наблюдалась положительная динамика в процессе лечения, что подтверждалось рентгенологическими и лабораторными исследованиями, представлены в табл. 2. Показатели клеточного иммунитета больных туберкулезом легких с МЛУ, для которых 6-месячное лечение оказалось неэффективным, приведены в табл. 3.

После 6 месяцев лечения больных туберкулезом с МЛУ, проводимого с учетом результатов чувствительности микобактерий туберкулеза к ПТП, ретроспективно было оценено влияние модели резистентности к ПТП и схемы проводимой ПТП на эффект лечения. Из 25 больных МЛУ туберкулезом, у которых после 6 месяцев лечения отсутствовал положительный ответ, 18 имели резистентность к препаратам второго ряда, причем 7 имели резистентность к фторхинолонам, а 5 – одновременно к фторхинолонам и инъекционным препаратам (канамицин, амикацин, каприомицин). У больных этой же группы, которые имели резистентность только к первой группе ПТП, количество препаратов первой группы, к которым отмечалась резистентность, было не меньше чем 4. Количество получаемых препаратов в процессе лечения, к которым сохранялась чувствительность микобактерий, было 4(3; 5), медиана (максимум; минимум). После трех месяцев химиотерапии у 4 больных этой группы была выявлена дополнительная (возможно развившаяся во время лечения) резистентность к получаемым препаратам.

Из 30 больных МЛУ туберкулезом, у которых после 6 месяцев лечения наблюдался положительный ответ, только 5 имели резистентность к препаратам второго ряда, причем один из больных имел резистентность к фторхинолонам. Из тех больных этой группы, которые имели резистентность только к первой группе ПТП, 6 больных имели резистентность к 4 и более

Таблица 2
Показатели Т-клеточного иммунитета у больных туберкулезом с МЛУ возбудителя при положительной динамике процесса в результате лечения (n=30)

Показатель	P (1, 3)	При установлении диагноза МЛУ	P (1, 2)	Через 2-3 мес лечения	P (2, 3)	Через 6 мес. лечения	Контроль (n=17)
Лимфоциты, мм ³	< 0,001	1648 (1286; 2007)*	< 0,001	2287 (1846; 2559)*	0,134	2389 (1953; 2659)	2554 (2434; 2654)
CD3+CD4+, мм ³	< 0,001	711 (700; 836)*	< 0,001	956 (853; 999)*	0,083	995 (907; 1126)	1018 (908; 1167)
CD3+CD8+, мм ³	< 0,001	358 (305; 418)*	< 0,001	434 (421; 588)	0,235	472 (409; 612)	498 (467; 609)
CD4+HLA-DR+, %	0,345	4,0 (3,0; 7,0)	0,242	4,2 (2,7; 7,2)	0,254	3,5 (3,0; 4,2)	3,0 (2,5; 4,0)
CD8+HLA-DR+, %	0,953	5,3 (3,0; 7,6)	0,560	4,8 (2,8; 6,9)	0,489	5,2 (3,1; 5,9)	5,3 (4,0; 6,1)
CD4+CD25+, мм ³	0,258	63 (52; 74)	0,451	58 (51; 72)	0,362	54 (50; 65)	56 (53; 77)
CD4+CD25+, %	0,386	3,2 (1,2; 5,3)	0,251	3,0 (1,0; 4,3)	0,311	2,9 (1,3; 4,1)	2,0 (1,0; 4,0)

Примечание. В табл. 2-4 данные представлены как медиана (интерквартильный размах); P (1, 2), P (1, 3), P (2, 3) – парный тест Уилкоксона; * – P < 0,05 при сравнении с контролем (U-тест Манна-Уитни).

Таблица 3
Показатели Т-клеточного иммунитета у больных туберкулезом с МЛУ возбудителя при прогрессировании процесса в ходе лечения (n=25)

Показатель	P (1, 3)	При установлении диагноза МЛУ	P (1, 2)	Через 2-3 мес лечения	P (2, 3)	Через 6 мес. лечения	Контроль (n=17)
Лимфоциты, мм ³	0,563	1755 (1196; 1999)*	0,474	1584 (1358; 1787)*	0,229	1646 (1289; 1800)*	2554 (2434; 2654)
CD3+CD4+, мм ³	0,455	738 (686; 910)*	0,361	716 (651; 874)*	0,259	727 (708; 832)*	1018 (908; 1167)
CD3+CD8+, мм ³	0,257	360 (297; 423)*	0,323	353 (313; 406)*	0,432	379 (307; 411)*	498 (467; 609)
CD4+HLA-DR+, %	0,373	3,5 (3,1; 7,3)	0,239	4,0 (2,8; 7,0)	0,271	3,7 (2,9; 4,4)	3,0 (2,5; 4,0)
CD8+HLA-DR+, %	0,724	5,0 (3,0; 7,3)	0,467	4,4 (2,7; 6,7)	0,394	5,0 (3,1; 5,7)	5,3 (4,0; 6,1)
CD4+CD25+, мм ³	0,346	67 (50; 76)	0,411	63 (51; 73)	0,287	67 (50; 75)	56 (53; 77)
CD4+CD25+, %	0,256	3,1 (1,1; 5,2)	0,307	3,2 (1,2; 4,3)	0,387	2,9 (1,2; 4,1)	2,0 (1,0; 4,0)

Таблица 4
Показатели В-клеточного иммунитета у больных туберкулезом с МЛУ возбудителя при положительной динамике процесса в результате лечения (n=30)

Показатель	P (1, 3)	При установлении диагноза МЛУ	P (1, 2)	Через 2-3 мес лечения	P (2, 3)	Через 6 мес. лечения	Контроль (n-17)
CD19+, мм ³	< 0,001	301 (189; 361)*	< 0,001	453 (334; 509)	0,556	433 (370; 480)	422 (381; 496)
CD19+, %	0,376	15 (11; 18)	0,554	16 (12; 21)	0,389	16 (14; 22)	19,0 (16,0; 24,0)
IgA, г/л	0,587	1,54 (1,18; 1,90)	0,345	1,60 (1,20; 1,89)	0,356	1,55 (1,10; 1,91)	1,56 (1,30; 1,98)
IgM, г/л	0,356	0,80 (0,54; 1,11)	0,467	0,84 (0,40; 1,07)	0,245	0,91 (0,36; 1,19)	0,81 (0,61; 1,12)
IgG, г/л	0,645	12,3 (9,4; 12,8)	0,423	13,2 (9,1; 14,1)	0,367	12,4 (8,5; 14,4)	12,2 (10,1; 13,25)

Таблица 5
Показатели В-клеточного иммунитета у больных туберкулезом с МЛУ возбудителя при прогрессировании процесса в ходе лечения (n=25)

Показатель	P (1, 3)	При установлении диагноза МЛУ	P (1, 2)	Через 2-3 мес лечения	P (2, 3)	Через 6 мес. лечения	Контроль (n-17)
CD19+, мм ³	0,356	273 (190; 364)*	0,567	319 (233; 402)*	0,434	297 (187; 399)*	422 (381; 496)
CD19+, %	0,245	14,1 (13,8; 18,0)	0,669	16,1 (12,0; 23,0)	0,336	17,1 (14,0; 23,2)	19,0 (16,0; 24,0)
IgA, г/л	0,334	1,46 (1,14; 1,89)	0,346	1,56 (1,17; 1,91)	0,447	1,56 (1,10; 1,96)	1,56 (1,30; 1,98)
IgM, г/л	0,445	0,79 (0,50; 1,12)	0,434	0,86 (0,35; 1,13)	0,288	0,92 (0,39; 1,22)	0,81 (0,61; 1,12)
IgG, г/л	0,567	12,3 (9,2; 12,6)	0,423	13,2 (9,0; 14,3)	0,365	12,5 (8,4; 14,6)	12,2 (10,1; 13,25)

ПТП. Количество получаемых препаратов в процессе лечения, к которым сохранялась чувствительность микобактерий, было 5(4; 6), медиана (максимум; минимум), это достоверно больше, чем у больных с отрицательной динамикой ($p=0,005$ при сравнении с соответствующим показателем группы с отрицательной динамикой лечения). В процессе химиотерапии ни у одного больного этой группы не было выявлено дополнительной резистентности к ПТП.

Заключение

Эффективная терапия больных туберкулезом с МЛУ приводит к увеличению и приближению абсолютного количества лимфоцитов к нормальным показателям. Отсутствие же положительной рентгенологической динамики и конверсии мокроты в процессе проводимой терапии сопровождается персистенцией абсолютной лимфопении. Уменьшение относительного содержания лимфоцитов после 3 месяцев лечения у больных с отрицательной динамикой свидетельствует скорее о том, что выявленные изменения не могут быть объяснены только процессами компартментализации лимфоцитов. Процессы клеточной мобилизации и про-

лиферации, характерные для ранней стадии заболевания, постепенно истощаются к 3 месяцам неадекватной терапии туберкулеза с МЛУ. В отличие от результатов, полученных при изучении субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR и CD25 антигены на ранних стадиях туберкулезного процесса [12], изучение динамики содержания этих субпопуляций в период более позднего лечения больных с МЛУ после установления модели чувствительности микобактерий к ПТП не выявило заметных изменений. Очевидно, данные изменения характерны только для самых ранних стадий туберкулезного воспаления.

Ответ на проводимую химиотерапию зависит и от модели резистентности микобактерий туберкулеза к ПТП. Наличие резистентности к большему количеству препаратов, а также к препаратам второго ряда или к нескольким группам препаратов второго ряда сочетается в последующем с отрицательной динамикой в процессе лечения. Количество применяемых препаратов, к которым сохранена чувствительность микобактерий, является вторым основным прогностическим фактором, определяющим ответ на проведение химиотерапии.

Литература

- Мишин В. Ю. Профилактика, диагностика и фармакотерапия некоторых инфекционных заболеваний. М.: 2002; 74-78.
- Новиков Д. К., Новиков П. Д. Клиническая иммунология. Витебск.: 2006.
- Stegelmann F, Bastian M., Swoboda K., et al. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin and perforin in CD8⁺ T cells provides a host defense mechanism against Mycobacterium tuberculosis. J Immunol. 2005; 175(11): 7474-83.
- Rodrigues D.S.S., Medeiros E., A., Weckx L.Y. et al. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. Clin. Exp. Immunol. 2002; 128: 149-54.
- Becher-Allan C., Brown J. A., Freeman G. J. et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. Immunol. 2001; 167: 1245-53.
- Singh M.M., Immunology of tuberculosis- an update. Ind. J. Tub. 1999; 46: 167-9.
- Raia A. Immunology of tuberculosis. Indian J Med Res 2004; 120: 213-32.
- Dieckmann D., Pottner H., Berchtold S. et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J. Exp. Med. 2001; 193: 1303-10.
- Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M. et al. Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J. Exp. Med. 2001; 193: 285-94.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J. et al. Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD4+ CD25+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. Immunol. Rev. 2001; 182: 18-32.
- De Valiere S., Abate G, Blasevic A. et al. Enhancement of innate cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. Infect. Immun. 2005; 73(10): 6711-20.
- Скрягина Е.М., Гуревич Г.Л., Суркова Л.К., и др. Показатели Т-клеточного иммунитета на ранних стадиях туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Медицинская панорама, 2007; 13 (81):19-22.

Статья поступила 15.12.2008 г.