

РОЛЬ ГАММА-ДЕЛЬТА-Т-КЛЕТОК В ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Е. Г. ЧУРИНА, О. И. УРАЗОВА, В. В. НОВИЦКИЙ, Т. Е. КОНОНОВА

ROLE OF GAMMA DELTA T CELLS IN THE IMMUNE RESPONSE TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

E. G. CHURINA, O. I. URAZOVA, V. V. NOVITSKY, T. E. KONONOVA

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Исследовано количество $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови у больных с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам и характера реакции на внутрикожное введение туберкулина (проба Манту). Показано, что численность $\gamma\delta$ T-клеток снижается при всех клинических формах туберкулезной инфекции, однако наиболее значительно снижение их числа отмечается при диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких, а также в случае наличия множественной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* (при инфильтративной и фиброзно-кавернозной формах заболевания) и при отрицательной реакции на пробу Манту у больных инфильтративным туберкулезом легких. Продемонстрированное снижение численности циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток в крови у больных туберкулезом легких способствует ослаблению первичного протективного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*.

Ключевые слова: туберкулез легких, гамма-дельта-T-клетки, иммунный ответ.

The peripheral blood count of $\gamma\delta$ T cells was investigated in patients with new-onset pulmonary tuberculosis depending on the clinical form of the disease, on *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to antituberculosis drugs, and on the response to intradermal tuberculin administration (Mantoux test). The count of $\gamma\delta$ T cells was shown to decrease in all clinical forms of tuberculosis infection; however, the most significant increase in their count was noted in disseminated and fibrocavernous pulmonary tuberculosis, as well as in the presence of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (in infiltrative and fibrocavernous forms of the disease) and a negative response to the Mantoux test in patients with infiltrative pulmonary tuberculosis. The demonstrated decrease in the count of circulating $\gamma\delta$ T cells in the blood of patients with pulmonary tuberculosis promotes a reduction in the protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: pulmonary tuberculosis, gamma delta T cells, immune response.

В иммунопатогенезе туберкулеза легких (ТБ) тесно взаимосвязаны механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, посредниками которых являются $\gamma\delta$ T-клетки. Они играют решающую роль не только в реализации ответа первой линии иммунной защиты на патоген, но и выполняют регуляторные и иммуносупрессорные функции.

Проникновение *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) во внутреннюю среду организма ведет к их локальному размножению и распространению до регионарного лимфатического узла. Однако длительный период генерации возбудителя обуславливает возможность формирования антигенспецифического адаптивного клеточного иммунитета до того момента, когда число макрофагов, инфицированных МБТ,

достигнет критической величины, обуславливающей повреждение тканей.

Известно, что $\gamma\delta$ T-клетки непосредственно участвуют в реализации противотуберкулезного иммунного ответа. Высокая активность по отношению к фосфоантигенам МБТ позволяет $\gamma\delta$ T-клеткам определять клетки-мишени, инфицированные даже одной микобактерией. Цитокиновым и контактным взаимодействием они вовлекают макрофаги и дендритные клетки в антигенспецифический иммунный ответ, главный феномен которого – сдерживание размножения возбудителя. Возможно, что именно этот механизм препятствует развитию заболевания у человека при первом контакте с инфекцией. Очевидно, что при недостаточном количестве субпопуляций резидентных и циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов

* Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (НПШ-614.2012.7).

Авторы выражают благодарность за помощь в организации исследований главному врачу ОГБУЗ «Томская областная туберкулезная клиническая больница», ассистенту кафедры фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, врачу высшей категории, канд. мед. наук Г. В. Яновой, заведующей кафедрой фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, доценту, д-ру мед. наук О. В. Филинук.

в организме возрастает риск диссеминации МБТ и клинической манифестации туберкулезной инфекции.

Цель исследования – определение количества $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови у больных ТБ в зависимости от клинической формы заболевания, характера реакции на пробу Манту и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам (ПТП).

Материалы и методы

Обследовано 140 больных с распространенным деструктивным впервые выявленным ТБ (90 мужчин и 50 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст – 47 ± 11 лет). Диагноз ТБ устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были разделены на 3 группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 75 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) – 40 человек, с фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТБ) – 25 человек. При делении больных ТБ на группы учитывали лекарственную чувствительность возбудителя к основным ПТП: группу пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, составили 83 человека; группу пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к ПТП основного ряда (изониазиду и рифампицину, а также стрептомицину, этамбутолу), – 57 человек; а также учитывали характер реакции на внутрикожное введение туберкулина: группу пациентов с положительной реакцией на пробу Манту составили 102 пациента, с отрицательной реакцией на пробу Манту – 38 пациентов.

В группу сравнения включили 75 здоровых добровольцев с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Исследовали периферическую венозную кровь, взятую утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл у здоровых добровольцев и у больных ТБ до назначения специфической химиотерапии.

Для определения количества $\gamma\delta$ TCR-позитивных лимфоцитов в периферической крови применяли метод лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител к лимфоцитарным рецепторам Anti-TCR- γ/δ -1, меченных PE (кат. № 333 141) («Becton Dickinson», США). Процедуры пробоподготовки и окрашивания лимфоцитов, экспрессирующих TCR- γ/δ , проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson», США). Измерение выполняли на проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson», США), укомплектованном аргонным лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ

полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X. Результаты выражали в процентах. Статистический анализ результатов исследования осуществляли с использованием стандартного пакета программ SPSS v.11.0.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования позволили установить, что содержание $\gamma\delta$ Т-клеток в периферической крови у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания снижалось по сравнению с их количеством у здоровых доноров. Наиболее существенное снижение числа клеток этой субпопуляции лимфоцитов регистрировали у пациентов с ДТБ и ФКТБ (табл., рис. 1-3). Содержание $\gamma\delta$ Т-клеток в крови у больных ИТБ с отрицательной реакцией на пробу Манту было сниженным в большей степени, чем у больных с положительной реакцией на пробу Манту с аналогичной клинической формой туберкулезной инфекции. В то же время у пациентов с ДТБ и ФКТБ содержание в крови $\gamma\delta$ Т-клеток, напротив, при отрицательной реакции на внутрикожное введение туберкулина было выше, чем при положительной реакции на пробу Манту (табл.). Кроме того, у туберкулин-положительных пациентов с ФКТБ данный показатель оказался ниже не только по сравнению с туберкулинотрицательными пациентами (в 1,7 раза), но и со здоровыми донорами (в 1,9 раза) (табл.).

Содержание $\gamma\delta$ Т-клеток в периферической крови у больных ИТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя было ниже нормы и по сравнению с таковым при ТБ с лекарственной чувствительностью (ЛЧ) возбудителя (у пациентов с ТБ с ЛЧ возбудителя оно не отличалось от контрольных значений). У пациентов с ДТБ, напротив, содержание $\gamma\delta$ Т-клеток существенно снижалось при лекарственно-чувствительном варианте заболевания. При ФКТБ количество $\gamma\delta$ Т-клеток в крови было сниженным у всех пациентов – и с ЛЧ МБТ и с МЛУ МБТ, но в последнем случае в большей степени (табл.).

Регуляция иммунного ответа является сложным и многокомпонентным процессом, при этом попытка отделить врожденный иммунитет от адаптивного выглядит по меньшей мере искусственной [2, 5]. На протяжении длительного времени иммунологи пытаются установить природу взаимосвязей между этими двумя механизмами, целью взаимодействия которых является обеспечение иммунного гомеостаза в организме человека.

Впервые $\gamma\delta$ Т-клетки были описаны в середине 1980-х годов японским иммунологом Н. Saito как гетерогенная субпопуляция Т-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором, состоящим из γ - и δ -цепей ($\gamma\delta$ TCR) [7]. Принято считать, что эта минорная

Относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, характера реакции на пробу Манту и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (%), Me (Q1 – Q3)

Группы исследования		Показатели		
Здоровые доноры		5,38 (4,42-6,74)		
Больные ТБ		ИТБ	ДТБ	ФКТБ
С учетом клинической формы заболевания		3,35 (2,86-4,15) $p_1 = 0,029$	2,34 (2,11-3,06) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,046$	1,72 (1,20-2,21) $p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,041$ $p_3 = 0,044$
С учетом характера реакции на пробу Манту	Отрицательная реакция на пробу Манту	1,34 (1,20-2,09) $p_1 = 0,012$	5,12 (4,05-7,36)	4,80 (2,13-7,05)
	Положительная реакция на пробу Манту	3,38 (2,58-4,68) $p_1 = 0,032$ $p_5 = 0,018$	3,71 (2,66-4,21) $p_1 = 0,033$ $p_5 = 0,041$	2,84 (1,55-3,12) $p_1 = 0,039$ $p_5 = 0,048$
С учетом чувствительности возбудителя	ЛЧ ТБ	4,55 (3,00-5,56)	2,14 (1,03-3,45) $p_1 = 0,036$	2,84 (2,02-4,91) $p_1 = 0,032$
	МЛУ ТБ	3,35 (2,91-4,50) $p_1 = 0,046$ $p_4 = 0,041$	4,68 (3,44-6,89) $p_4 = 0,038$	2,19 (1,77-2,79) $p_1 = 0,027$

Примечание: ТБ – туберкулез легких; ИТБ – инфильтративный туберкулез легких; ДТБ – диссеминированный туберкулез легких; ФКТБ – фиброзно-кавернозный туберкулез легких; ЛЧ ТБ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; МЛУ ТБ – туберкулез легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя; p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; p_2 – у больных ИТБ; p_3 – у больных ДТБ; p_4 – у больных с ЛЧ ТБ; p_5 – у больных ТБ с отрицательной реакцией на пробу Манту.

субпопуляция Т-лимфоцитов сочетает в себе свойства как клеток врожденного, так и приобретенного иммунитета. Относительно недавно $\gamma\delta$ T-клетки рядом авторов были отнесены к естественным регуляторным Т-клеткам с иммуносупрессорной активностью [9, 10]. Выделяют циркулирующие и резидентные $\gamma\delta$ T-лимфоциты. Циркулирующие $\gamma\delta$ T-лимфоциты составляют в среднем 1-10% от мононуклеаров периферической крови и экспрессируют Т-клеточный рецептор CD3⁺Vg9Vd2⁺TCR. Численность Vg9Vd2⁺ Т-клеток во время их постнатальной экспансии и селекции определяется факторами окружающей среды, главным образом инфекционными агентами. Для циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов более характерен тимусзависимый способ развития. Основной биологической функцией этих клеток является элиминация патогенов [3, 4, 6]. Резидентные $\gamma\delta$ T-лимфоциты экспрессируют CD3⁺Vd1⁺ или CD3⁺Vd3⁺TCR и доминируют в слизистых оболочках желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов. Большинство резидентных $\gamma\delta$ T-клеток развиваются тимуснезависимым способом. Помимо выполнения эффекторной цитотоксической функции, резидентные $\gamma\delta$ T-лимфоциты играют большую роль в иммунорегуляции и иммунологическом надзоре организма [3, 10].

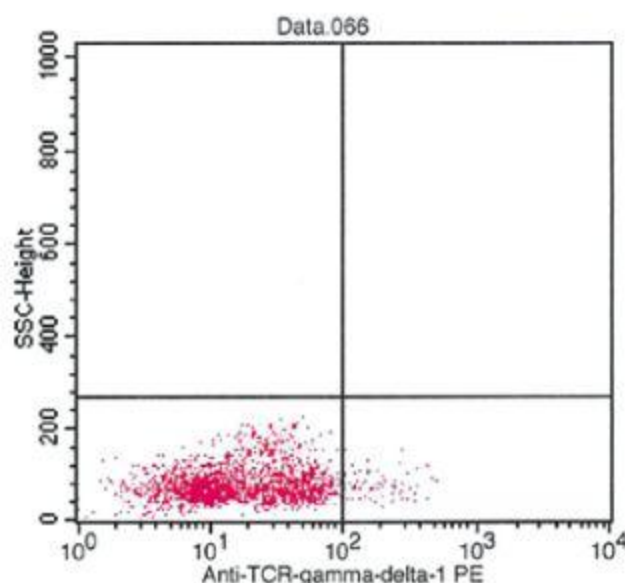


Рис. 1. Индивидуальная гистограмма распределения $\gamma\delta$ T-клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ TCR, у больного инфильтративным туберкулезом легких [больной С., 53 года, диагноз: инфильтративный туберкулез S1-2 правого легкого в фазе распада и обсеменения, МБТ (+)]. Относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток (правый нижний квадрант) 6,21%

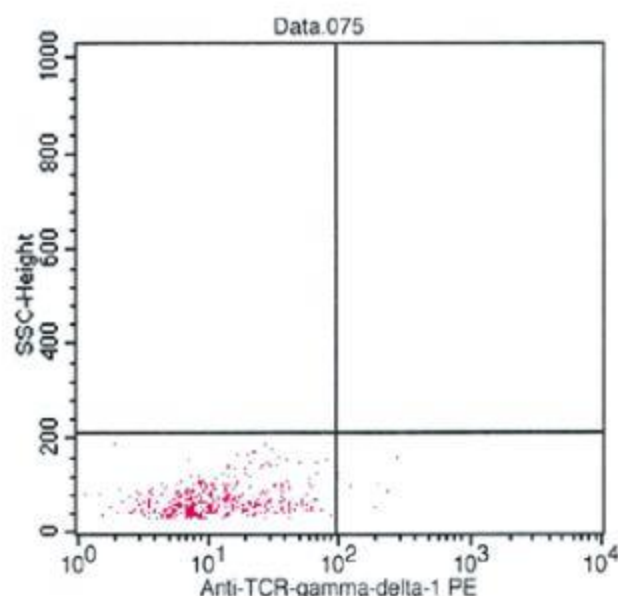


Рис. 2. Индивидуальная гистограмма распределения $\gamma\delta$ T-клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ TCR, у больного диссеминированным туберкулезом легких [больной К., 33 года, диагноз: подострый диссеминированный туберкулез легких в фазе инфильтрации и распада, МБТ (+)]. Относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток (правый нижний квадрант) 3,32%

$\gamma\delta$ T-клетки являются основным составляющим компонентом лимфоидной ткани бронхоальвеолярного тракта (*Bronchus-associated lymphoid tissue*), которая не является постоянным образованием: она есть не у всех людей и может исчезать или, напротив, появляться в зависимости от антигенной нагрузки. Не вызывает сомнений, что при ТБ антигенная нагрузка на респираторный тракт очень высока и локальный эффективный иммунный ответ в данном случае весьма актуален. При проникновении *M. tuberculosis* в организм человека в первую очередь инициируется иммунитет слизистых оболочек (мукозальный иммунитет) в лимфоидной ткани респираторного тракта, после чего возможна миграция альвеолярных макрофагов и дендритных клеток в регионарные лимфатические узлы, и развитие во вторичных лимфоидных органах специфического иммунного ответа с формированием эффекторных клеток и клеток памяти. То есть иммунный ответ на патоген разворачивается в нескольких местах, соединенных между собой путями рециркуляции (миграции). Выявленный дефицит циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у больных ТБ может быть обусловлен пополнением пула резидентных $\gamma\delta$ T-клеток в ткани респираторного тракта для поддержания локального иммунного ответа, репарации и интегративности альвеолярного эпителия [6, 9]. Гибель циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток можно связать с активацией антиген-индуцированного рецепторного апоптоза при ДТБ, в том числе и опосредованного иммуносупрессорными эффектами регуляторных T-клеток [1, 8].

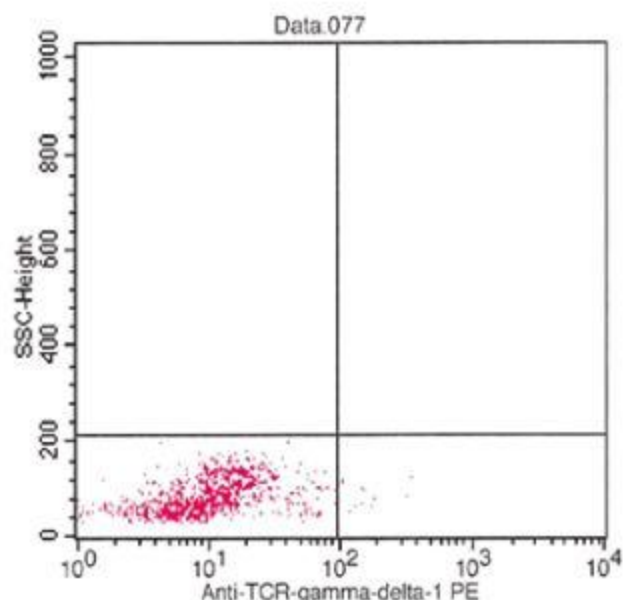


Рис. 3. Индивидуальная гистограмма распределения $\gamma\delta$ T-клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ TCR, у больного фиброзно-кавернозным туберкулезом легких [больной Ф., 50 лет, диагноз: фиброзно-кавернозный туберкулез верхней доли правого легкого в фазе инфильтрации и обсеменения, МБТ (+)]. Относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток (правый нижний квадрант) 1,96%

У пациентов с ТБ минимальное количество циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток зафиксировано у больных ИТБ с отрицательной реакцией на пробу Манту, а также в случае ИТБ с МЛУ МБТ. Не исключается, что отсутствие эффективного протективного иммунного ответа на фоне ограниченных возможностей применения противотуберкулезных препаратов у этих больных в дальнейшем может привести к быстрому распаду туберкулезных инфильтратов и диссеминации инфекции.

Интересен тот факт, что при ДТБ и ФКТБ у туберкулиннегативных пациентов и у пациентов с ДТБ с МЛУ возбудителя численность циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток не отличалась от таковой у здоровых доноров. Вполне вероятно, что при тяжелых и осложненных вариантах течения туберкулезной инфекции количество резидентных $\gamma\delta$ T-клеток в респираторном тракте уже не играет принципиальной защитной роли и они частично мигрируют в циркуляцию. Фосфоантигены микобактерий являются активаторами $\gamma\delta$ T-лимфоцитов [5], при этом для ДТБ и ФКТБ в большинстве случаев характерна бактериемия. Следовательно, присутствие $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови в этой ситуации необходимо для сдерживания распространяющейся инфекции. Логично предположить, что пополнение пула циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у больных ТБ с МЛУ возбудителя и пациентов с отрицательной реакцией на пробу Манту в определенной степени является компенсаторным механизмом, который способ-

ствуется оптимальному функционированию иммунной системы в сложившихся неблагоприятных условиях.

Заключение

Подводя итог, отметим, что $\gamma\delta$ T-клетки представляют собой популяцию T-лимфоцитов, которой присущи свойства и функции как клеток врожденного, так и адаптивного иммунитета, свидетельствующие об уникальной биологической роли $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в регуляции иммунного ответа и его эффекторных реакциях. Исследования в области врожденного иммунитета за последние годы дали новую информацию о специфичности, способе активации и функциях $\gamma\delta$ T-клеток *in vitro* и *in vivo*. Абсолютно доказанным является тот факт, что эффективная реализация антигенспецифического адаптивного иммунитета невозможна без предварительной активации врожденного иммунитета. Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ТБ снижение количества циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток обуславливает неэффективный иммунологический надзор на уровне врожденного иммунитета. Отметим, что клинические формы туберкулезной инфекции, сочетанные с МЛУ возбудителя и туберкулиновой анергией, ассоциированы с минимальной численностью $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в крови у больных ТБ. Таким образом, дефицит количества циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток способствует ослаблению первичного протективного иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чуриша Е. Г., Уразова О. И., Новицкий В. В. Регуляторные T-клетки. Иммуносупрессорные эффекты при туберкулезе легких. Saarbrücken, LAP LAMBERT Academic Publishing. – GmbH & Co. KG. 2012.

2. Beutler B., Hoffmann J. What infections actually are // J. Innate. Immun. – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 2-3.
3. Bonneville M., Fournie J. Sensing cell stress and transformation through V γ 9V δ 2⁺ T-cell mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites // Microbes Infection. – 2005. – Vol. 7. – P. 503-509.
4. Han G., Geng S., Li Yu et al. $\gamma\delta$ T-cell function in sepsis is modulated by C5a receptor signaling // Immunology. – 2011. – № 133. – P. 340-349.
5. Meraviglia S., El Daker S., Dieli F. et al. $\gamma\delta$ T Cells cross-link innate and adaptive immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection // Clin. Developm. Immunol. – 2011. Article ID 587315, 11 p.
6. Morita C. T., Jin C., Sarikonda G., Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2⁺ T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens // Immunol. Rev. – 2007. – № 215. – P. 59-76.
7. Saito H., Kobayashi H., Takeno S. et al. Fetal toxicity of benzodiazepines in rats // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. – 1984. – Vol. 46, № 3. – P. 437-447.
8. Shevach E. M., Davidson T. Regulatory T cells. 2012. Posters. Nat. // Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 146-147.
9. Witherden D. A., Havran W. L. Molecular aspects of epithelial $\gamma\delta$ T cell regulation // Trends. Immunol. – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 265-271.
10. Xi X., Han X., Li L., Zhao Z. $\gamma\delta$ T cells response to *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis patients using preponderant complementary determinant region 3 sequence // Indian J. Med. Res. – 2011. – Vol. 134. – P. 356-361.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Чуриша Елена Георгиевна

Сибирский государственный медицинский университет,
доктор медицинских наук, ассистент кафедры
патофизиологии.

634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2.

Тел.: 8 (3822) 55-36-13.

E-mail: lena1236@yandex.ru

Поступила 16.10.2013