

FAS (CD95) антиген и продукция фактора некроза опухоли- α в периферической крови больных с разными клиническими проявлениями туберкулеза

Т.Ю.Салина¹, Т.И.Морозова^{1,2}

1 – ГБОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского" Минздрава России: 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112;

2 – ГБУЗ "Областной клинический противотуберкулезный диспансер": 410056; Саратов, ул. Вольская, 22

Резюме

Фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и семейство его рецепторов, включая Fas (CD95), играют важную роль в патогенезе туберкулеза легких (ТЛ). *Цель.* Изучение особенностей экспрессии Fas (CD95) и продукции TNF- α в периферической крови больных с разными клиническими проявлениями ТЛ. *Материалы и методы.* Обследованы больные ($n = 54$) активным ТЛ разной степени тяжести и здоровые ($n = 22$). Число CD95-клеток определялось методом иммунофенотипирования лимфоцитов. Уровень спонтанной и индуцированной *Mycobacterium bovis* продукции TNF- α определялся методом иммуноферментного анализа в супернатантах 24-часовых культур мононуклеарных клеток периферической крови. *Результаты.* Установлено достоверное повышение CD95-клеток и уровня спонтанной продукции TNF- α у больных с тяжелыми и осложненными формами ТЛ по сравнению с благоприятно протекающими формами ТЛ и со здоровым контролем. Показана зависимость числа CD95-клеток от наличия фазы распада и бактериовыделения. *Заключение.* По результатам исследования улучшилось понимание иммунопатологических механизмов развития ТЛ и созданы условия для поиска путей целенаправленных иммунореабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: туберкулез легких, апоптоз, CD95, фактор некроза опухоли- α .

DOI: 10.18093/0869-0189-2015-25-4-456-460

Fas (CD95) antigen and Tumor necrosis factor- α blood concentration in patients with different manifestations of tuberculosis

T.Yu.Salina¹, T.I.Morozova^{1,2}

1 – State Institution "V.I.Razumovskiy Saratov State Medical University", Healthcare Ministry of Russia: 112, Bol. Kazach'ya str., Saratov, 410012, Russia;

2 – State Institution "Regional Clinical Tuberculosis Institution": 22, Vol'skaya, Saratov, 410056, Russia

Summary

The aim of this study was to investigate Fas (CD95) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) expressions in patients with different manifestations of tuberculosis (TB). *Methods.* The study involved 54 patients with active pulmonary TB of different severity and 22 healthy volunteers. CD95 cell number was counted by lymphocyte immunophenotyping. Spontaneous and stimulated TNF- α production by *Mycobacterium bovis* (BCG) was assessed in the supernatant of 24^h blood mononuclear cell culture using the ELISE method. *Results.* Patients with severe and complicated TB had significantly increased both CD95 number and spontaneous TNF- α production in comparison to patients with milder TB course and to healthy volunteers. CD95 cell number was associated with cavitation and positive culturing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Conclusion.* These results improve our knowledge of immunopathology of TB and facilitate further search for targeted immune rehabilitation.

Key words: pulmonary tuberculosis, apoptosis, CD95, Tumor necrosis factor- α .

Одним из ведущих механизмов защиты в ответ на внедрение инфекционного агента, в т. ч. *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), является воспаление. Важная роль в поддержании гомеостаза в организме отводится апоптозу [1–3]. В последние годы апоптоз рассматривается не только как способ негативной селекции аутореактивных клонов, но и как механизм регуляции иммунного ответа [4, 1]. Повышенная готовность клеток к апоптозу сопровождается экспрессией Fas-рецептора (CD95), при взаимодействии которого со специфическим лигандом (*FasL*) инициируется процесс апоптотической гибели клетки [4, 1]. От Fas (CD95) зависит выживание и устранение определенных субпопуляций лимфоцитов в период их созревания [4]. Важная роль в регуляции клеточной гибели принадлежит и фактору некроза опухоли- α (TNF- α), относящемуся к этому же су-

персемейству, рецепторы которого сходны по строению с Fas и имеют в своей структуре аналогичные внутриклеточные "домены смерти", контролирующие выживание клеток [4]. TNF- α играет в человеческом организме роль медиатора, участвующего в кооперации лимфоцитов и макрофагов при реализации иммунного ответа [5, 6], индукции и освобождении интерлейкина-1. TNF- α оказывает регуляторный эффект на активность фибробластов, активизирует полиморфно-ядерные клетки, стимулируя фагоцитоз и адгезию клеток к эндотелию сосудов. С помощью TNF- α формируются гранулемы, индуцируется образование активных форм кислорода, которые вызывают деструкцию мембран и гибель клетки-мишени по механизму некроза [4, 1].

Туберкулез легких (ТЛ) относится к иммунокомпromетированным заболеваниям, при котором

состояние иммунореактивности является ключевым фактором течения и исхода [7–9]. В настоящее время актуально изучение взаимосвязи количественного содержания клеток, экспрессирующих *Fas* (CD95), и уровня продукции TNF- α иммунокомпетентными клетками с клиническими проявлениями ТЛ, т. к. при этом становится более четким понимание патогенетических механизмов развития туберкулезного процесса.

Целью исследования явилось изучение особенностей экспрессии *Fas* (CD95) и продукции TNF- α в периферической крови больных с разными клиническими проявлениями ТЛ.

Материалы и методы

Под наблюдением находились пациенты ($n = 54$: 24 мужчины, 30 женщин; возраст – 17–62 года). Впервые выявленный, преимущественно инфильтративный ТЛ отмечен у 38 (70,4 %), ТЛ в фазе распада – у 21 (38,9 %), бактериовыделение (БВ) – МБТ⁺ – у 26 (48,2 %) больных. Все пациенты находились на лечении в ГБУЗ "Областной клинический противотуберкулезный диспансер". Группу контроля составили здоровые лица ($n = 22$). В зависимости от клинических проявлений и тяжести течения ТЛ больные распределены на 2 группы: 1-я ($n = 18$) – пациенты с тяжелыми и осложненными формами ТЛ, включая остро прогрессирующее течение: казеозная пневмония, генерализованный ТЛ, туберкулезный менингит отмечены у 9 (50 %) человек. У 10 (55,6 %) пациентов 1-й группы наблюдались осложнения туберкулезного процесса в виде кахексии, легочно-сердечной и дыхательной недостаточности, спонтанного пневмоторакса, экссудативного плеврита, геморрагического синдрома. Во 2-ю группу ($n = 36$) были включены лица с ограниченными и благоприятно протекающими формами ТЛ (инфильтративный без распада и выраженного интоксикационного синдрома, мелкие туберкулемы).

Критерии исключения: ТЛ с тяжелой сопутствующей патологией с нарушением функции иммунной системы, инфекция вирусом иммунодефицита человека, лечение иммуноотропными препаратами.

У всех пациентов исходно (до начала антибактериальной терапии) определялись число *Fas* (CD95) клеток и уровни спонтанной и индуцированной специфическим антигеном *Mycobacterium bovis* (БЦЖ) продукции TNF- α в периферической крови. CD95-клетки определялись методом иммунофенотипирования лимфоцитов [10], основанным на выявлении мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток с помощью моноклональных антител (анти-CD95). Определение TNF- α проводилось в супернатантах 24-часовых культур мононуклеарных клеток, выделенных из периферической венозной крови с помощью градиентного центрифугирования (фиколлурографин; $p = 1,076$ при 200 g). Мононуклеарные клетки культивировались в среде RPMI (*Flow Laboratories*, Великобритания), содержащей 10%-ную инактивированную нагреванием эмбриональную те-

лячью сыворотку, 2 mM глутамин и по 100 ед / мл пенициллина и стрептомицина в атмосфере повышенной влажности и CO₂ при температуре 37 °C. Изучалась спонтанная (не стимулированная), индуцированная *M. bovis* продукция TNF- α . *M. bovis* предварительно культивировались на среде Левенштейна–Йенсена и использовались в рабочей концентрации 50 мкг / мл. Оценка содержания TNF- α проводилась методом иммуноферментного анализа (*Cytokine*, Россия) с использованием иммуноферментного анализатора ("Линкей", Россия). Концентрация TNF- α (пг / мл) определялась путем построения калибровочной кривой по результатам титрования рекомбинантного TNF- α в качестве стандарта.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с использованием компьютерных программ для *Windows XP* и *Statistica 6*. Использовалась методика описательной статистики, в т. ч. вычисление среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (m), медианы (Me), моды (Mo), интервал наименьших (min) и наибольших значений (max). Сравнение 2 групп, подчиняющихся нормальному распределению, проводилось с помощью t-критерия Стьюдента, а не подчиняющихся нормальному распределению – теста Уилкоксона. Для оценки достоверности рассчитывалась величина p , указывающая вероятность безошибочного прогноза. В качестве критического уровня достоверности был принят критерий 0,05.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у пациентов с ТЛ ($n = 54$) в острую фазу болезни (до начала антибактериальной терапии) регистрировалось достоверное увеличение в периферической крови числа CD95-клеток ($M = 40,3 \pm 1,7$ %; $Me = 39$; $Mo = 50$, диапазон колебаний – 15,4–71,6) по сравнению со здоровыми ($M = 23,0 \pm 1,4$ %; $Me = 23,5$; $Mo = 32$; диапазон колебаний – 12,7–32,2; $p = 0,0008$).

Наиболее высокий уровень экспрессии маркера *Fas* (CD95) установлен у пациентов 1-й группы с тяжелыми деструктивными и осложненными формами ТЛ по сравнению с больными 2-й группы с ограниченными и благоприятно протекающим ТЛ и здоровыми (табл. 1).

В дальнейшем проводилось сравнение количества *Fas* (CD95) клеток у всех больных ТЛ в зависимости от наличия или отсутствия деструктивных изменений в легких и БВ. Пациенты были выделены из общего числа. Образование деструкции в легком является важным и часто критическим этапом в клинической картине ТЛ, течения и исходе заболевания [11]. У больных с деструктивными изменениями в легких (фаза распада) уровень экспрессии *Fas* (CD95) был достоверно выше по сравнению с пациентами без распада. Аналогичные изменения были получены и у пациентов с БВ. У больных ТЛ, в мокроте которых методами микроскопии мазка с окраской по Циль–Нильсену и посева на твердые питательные среды (Левенштейна–Йенсена и Финна 2)

Таблица 1
Количество клеток, экспрессирующих маркер Fas (CD95), в периферической крови больных активным ТЛ в зависимости от тяжести заболевания

Table 1
Number of blood cells expressing Fas (CD95) in patients with active pulmonary tuberculosis according to the disease severity

Показатель	1-я группа, n = 18	2-я группа, n = 36	Контроль, n = 22	p
Диапазон колебаний, min / max, %	20,0–71,6	15,4–57,7	12,7–32,2	1–2 = 0,0386
M \pm m, %	46,1 \pm 3,6	37,4 \pm 1,9	23,0 \pm 1,4	
Me	45	38,6	23,5	1–3 = 0,0003
Mo	–	50	32	2–3 = 0,0002

Примечание: min – минимальное, max – максимальное значение переменных в вариационном ряду.

были обнаружены МБТ, выявлено большее количество клеток, экспрессирующих маркер Fas (CD95) по сравнению с пациентами без БВ (табл. 2).

Выдвинуто предположение, что инициатором экспрессии Fas (CD95) могут являться как сами МБТ, так и продукты распада тканей при деструктивных процессах.

При изучении спонтанной продукции TNF- α установлено значительное (в десятки раз) повышение уровня TNF- α у пациентов 1-й группы по сравнению с 2-й и здоровыми лицами (табл. 3). Самый высокий уровень TNF- α (1 200–4 660 пг / мл) зарегистрирован у 11 (61,1 %) пациентов с выраженным интоксикационным синдромом и высокой лихорадкой. Несколько меньшие значения – 210–500 пг / мл выявлены у 3 (16,6 %) пациентов 1-й группы, а у 4 (22,2 %) больных уровень TNF- α оставался низким, несмотря на тяжелое течение туберкулезного процесса. В дальнейшем, несмотря на проводимое лечение, у 3 из этих 4 пациентов наблюдался летальный исход, что свидетельствует о том, что при крайне тяжелом состоянии у больных истощаются функциональные резервы иммунокомпетентных клеток. Возможно, это связано с рефрактерностью клеток, находящихся в состоянии продукции цитокинов, к новому воздействию индуктора, или с повреждением иммунокомпетентных клеток. Последнее предположение подтверждается наличием при активном ТЛ

процессов, связанных с апоптозом иммунных клеток в виде увеличения уровня проапоптогенного цитокина TNF- α и роста числа лимфоцитов с готовностью к Fas-зависимому апоптозу, особенно выраженное у тяжелых больных. Не установлено достоверных различий по уровню спонтанной продукции TNF- α у пациентов 2-й группы (с ограниченными и благоприятно протекающими формами ТЛ) по сравнению со здоровыми.

По результатам данного исследования выявлен большой размах индивидуальных значений продукции TNF- α в ответ на стимуляцию *M. bovis* у тяжелых больных: в 1-й группе низкий уровень ответа мононуклеарных клеток на *M. bovis* – у 10 (55,6 %) из 18 пациентов с тяжелым прогрессирующим течением туберкулезного процесса (колебания от 0 до 150 пг / мл), однако в 8 случаях ответная реакция на БЦЖ оказалась высокой (от 380 до 1 000 пг / мл), несмотря на продолжающуюся отрицательную динамику туберкулезного процесса. В 1-й группе достоверных различий по уровню индуцированной *M. bovis* продукции TNF- α по сравнению со здоровыми не получено ($Me = 130$, $Mo = 0$ vs $Me = 270$, $Mo = 200$ соответственно; $p = 0,2762$). У больных 2-й группы отмечался более низкий ответ продукции TNF- α на стимуляцию *M. bovis* по сравнению со здоровыми ($Me = 0$, $Mo = 0$ vs $Me = 270$, $Mo = 200$; $p = 0,0154$). Данные представлены в табл. 3.

Таблица 2
Экспрессия Fas (CD95) на лимфоцитах больных ТЛ в зависимости от наличия или отсутствия деструктивных изменений в легких и БВ

Table 2
Fas (CD95) expression in lymphocytes of TB patients according to cavitation and Mycobacterium tuberculosis culturing

Группы обследованных	M \pm m, %	Me	Mo	Диапазон колебаний, min / max
ТЛ:				
CV ⁺ , n = 21	41,5 \pm 2,9	42,8	45,5	24,5–71,6
CV ⁻ , n = 33	33,2 \pm 3,1	35,3	42,7	15,4–44,4
	$p_{1-2} = 0,0093$			
БВ:				
МБТ ⁺ , n = 26	47,2 \pm 3,7	42,8	45,5	27,8–71,6
МБТ ⁻ , n = 28	35,3 \pm 2,6	35,3	42,7	15,4–57,7
	$p_{3-4} = 0,0231$			

Примечание: CV⁺ – наличие фазы распада, CV⁻ – отсутствие фазы распада легочной ткани.

Спонтанная и индуцированная *M. bovis* продукция TNF- α периферическими мононуклеарными клетками крови больных ТЛ в зависимости от тяжести заболевания

Table 3

Spontaneous and stimulated by *M. bovis* TNF- α production in peripheral blood mononuclear cells in TB patients according to severity of the disease

Показатель	1-я группа, n = 18	2-я группа, n = 36	Контроль, n = 22	p
Спонтанная продукция TNF-α, пг / мл				
Диапазон колебаний, min / max	150–4 660	60–250	80–200	1–2 = 0,0004
Me	800	85	112	1–3 = 0,0002
Mo	150	60	112	2–3 = 0,7701
Индуцированная <i>M. bovis</i> продукция TNF-α, пг / мл				
Диапазон колебаний, min / max	0–1 000	0–180	125–600	1–2 = 0,0455
Me	130	0	270	1–3 = 0,2762
Mo	0	0	200	2–3 = 0,0154

Заключение

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

- у всех больных активным ТЛ наблюдается повышенный уровень CD95-клеток в периферической крови по сравнению со здоровыми;
- уровень экспрессии активационного маркера *Fas* (CD95) зависит от клинических проявлений и тяжести течения ТЛ и наиболее выражен у пациентов с тяжелыми, распространенными и осложненными формами ТЛ;
- экспрессия *Fas* (CD95) также зависит от наличия или отсутствия деструктивных изменений в легких и БВ;
- у больных с тяжелыми, распространенными и осложненными туберкулезными процессами наблюдаются значительные изменения спонтанной продукции TNF- α периферическими мононуклеарными клетками крови, характеризующиеся гиперпродукцией TNF- α ;
- наблюдаются большой размах индивидуальных значений уровня индуцированной специфическим антигеном *M. bovis* продукции TNF- α у пациентов с тяжелыми и осложненными формами ТЛ и отсутствие достоверных различий по сравнению со здоровыми.

По результатам исследования улучшилось понимание иммунопатологических механизмов развития ТЛ и созданы условия для поиска путей целенаправленных иммунореабилитационных мероприятий.

Литература

1. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР Медиа; 2010.
2. Борзакова С.Н., Аксенова В.А., Рейзис А.Р. Апоптоз лимфоцитов при лекарственно-индуцированных поражениях печени на фоне туберкулеза у детей. *Гастроэнтерология*. 2012; 9 (77): 67–72.
3. Шилько Т.А. Патогенетические факторы модуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких: Дисс. ... д-ра мед. наук. Томск; 2009.
4. Ройт А., Бростофф Д.Ж., Мейл. Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир; 2000.

5. Dheda K., Schwander S.K., Zhu B. et al. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010; 15 (3): 433–450.
6. Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Свойства и роль фактора некроза опухолей альфа в патогенезе ВИЧ-инфекции. *Казанский медицинский журнал*. 2012; 93 (2): 290–293.
7. Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В и др. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2012; 3: 79–86.
8. Мордык А.В., Цыганкова Е.А., Пузырева Л.В., Турецца А.А. Противотуберкулезный иммунитет и механизмы его формирования (обзор литературы). *Дальневосточный медицинский журнал*. 2014; 1: 126–130.
9. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В. и др. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2010; 3: 42–50.
10. Новиков П.Д., Новиков Д.К. Сравнительная характеристика методов иммунофенотипирования лимфоцитов. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2000; 1: 62–66.

Поступила 18.02.15

УДК 616.24-002.5-07:616.15-092

References

1. Yarilin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR Media; 2010 (in Russian).
2. Borzakova S.N., Aksenova V.A., Reyzis A.R. Lymphocyte apoptosis in anti-tuberculosis drug-induced hepatic injury. *Gastroenterologiya*. 2012; 9 (77): 67–72 (in Russian).
3. Shil'ko T.A. Pathogenic factors modulating blood mononuclear cell apoptosis in pulmonary tuberculosis: Dis. Tomsk; 2009 (in Russian).
4. Roitt I., Brostoff D.J., Male D. Immunology. Translated from English. Moscow: Mir; 2000 (in Russian).
5. Dheda K., Schwander S.K., Zhu B. et al. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010; 15 (3): 433–450.
6. Dunaev P.D., Boychuk S.V., Mustafin I.G. Properties and a role of TNF- α for the pathogenesis of HIV-infection. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 93 (2): 290–293 (in Russian).

7. Esimova I.E., Urazova O.I., Novitskiy V.V. et al. Causes of immune response dysregulation in pulmonary tuberculosis: a role of *M. tuberculosis*. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2012; 3: 79–86 (in Russian).
8. Mordyk A.V., Tsygankova E.A., Puzyreva L.V., Turitsa A.A. Anti-tuberculosis immunity and mechanisms of its development (review). *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 1: 126–130 (in Russian).
9. Voronkova O.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V. et al. Immune imbalance in different clinical and pathogenic variants of acute progressive pulmonary tuberculosis. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2010; 3: 42–50 (in Russian).
10. Novikov P.D., Novikov D.K. A comparison of methods of lymphocyte immunophenotyping. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2000; 1: 62–66 (in Russian).

Received February 02, 2015

UDC616.24-002.5-07:616.15-092

Информация об авторах

Салина Татьяна Юрьевна – д. м. н., доцент кафедры фтизиатрии ФПК и ППС ГБОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского" Минздрава России; тел.: (8452) 26-56-08; e-mail: SalinaTU@rambler.ru

Морозова Татьяна Ивановна – д. м. н., профессор, зав. кафедрой фтизиатрии ФПК и ППС ГБОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет В.И. Разумовского" Минздрава России, главный врач ГБУЗ "Областной клинический противотуберкулезный диспансер"; тел. / факс: (8452) 26-16-90; e-mail: dispans@san.ru

Authors Information

Salina Tat'yana Yur'evna, MD, Associate Professor at Department of Phthisiatrics, Physician Postgraduate Education Faculty, State Institution "V.I.Razumovskiy Saratov State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; tel.: (8452) 26-56-08; e-mail: SalinaTU@rambler.ru

Morozova Tat'yana Ivanovna, MD, Professor, Head of Department of Phthisiatrics, Physician Postgraduate Education Faculty, State Institution "V.I.Razumovskiy Saratov State Medical University", Healthcare Ministry of Russia; Hospital Chief Executive Officer at State Institution "Regional Clinical Tuberculosis Institution"; tel. / fax: (8452) 26-16-90; e-mail: dispans@san.ru