УДК 616.24-002.5

СПОНТАННАЯ И АНТИГЕН-СТИМУЛИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ГРАНУЛИЗИНА В КУЛЬТУРЕ КРОВИ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕГОЧНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА**Авербах М.М., Панова Л.В., Губкина М.Ф. Горелова Л.А., Дудченко А.В.***ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, e-mail: amm50@mail.ru*

Проведен анализ спонтанной и антиген-стимулированной (ППД 20 мкг/мл) выработки антимикробного фактора неспецифического иммунитета гранулизина в культуре периферической крови детей и подростков, больных различными формами деструктивного (n=29) и ТВГЛУ/очагового (n=39) туберкулеза органов дыхания до начала курса противотуберкулезной химиотерапии. Показана достоверно более высокая спонтанная и ППД-стимулированная продукция гранулизина у больных ТВГЛУ/очаговым туберкулезом по сравнению с деструктивным туберкулезом и контролем (латентный туберкулез). Полученные данные указывают на высокую активность основного фактора неспецифического иммунитета по «малых» формам туберкулеза органов дыхания.

Ключевые слова: туберкулез, дети, подростки, гранулизин, культура крови**SPONTANEOUS AND ANTIGEN-STIMULATED GRANULYSIS PRODUCTION IN BLOOD CULTURE OF CHILDREN WITH VARIOUS FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS****Averbah M.M., Panova L.V., Gubkina M.F., Gorelova L.A., Dudchenko A.V.***Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, e-mail: amm50@mail.ru*

The analysis of spontaneous and antigen-stimulated (PPD 20 µg / ml) antimicrobial factors of nonspecific immunity granulysin was evaluated in a culture of peripheral blood of children and adolescents with various forms of destructive (n = 29) and tuberculosis lymphadenitis / local form (n = 39) of pulmonary tuberculosis before the starting course of treatment for TB. It demonstrated a significantly higher spontaneous and PPD-stimulated production granulizina patients tuberculosis lymphadenitis /local form I tuberculosis in comparison with destructive tuberculosis and control (latent TB). These data indicate a high activity of the main factors of nonspecific immunity for «small» forms of pulmonary tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, children, teenagers, granulysin, cell cultura in vitro

Гранулизин наряду с рядом других цитолитических молекул (кателидин, перфорин, гранзим) относят к веществам, обеспечивающим различные механизмы врожденного иммунитета. Он синтезируется в гранулах активированных цитотоксических CD8⁺ Т клетках и NK-клетках в виде молекулы 15 kDa и частично 9 kDa. Последняя молекула является наиболее активной и цитотоксическим действием на опухолевые клетки и широкий спектр грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий и внутриклеточных бактерий (*Mycobacterium tuberculosis* и *Plasmodium falciparum*). Применительно к *M. tuberculosis* гранулизин повреждает клеточную стенку через нарушение метаболизма липидов [14]. Кроме того, гранулизин индуцирует экспрессию генов различных провоспалительных цитокинов и хемокинов (RANTES, MCP-1, MCP-3, MIP-1α, IL-10, IL-1, IL-6 и IFN-α) [5]. Также показано, что небольшая часть субпопуляции CD4⁺ Т клеток может лизировать *M. tuberculosis*-инфицированные макрофаги с использованием молекул гранулизина и перфорина [10]. Кроме того, показано, что при вакцинации

БЦЖ образуются CD4⁺ Т клетки памяти, обладающие способностью экспрессировать гранулизин и перфорин [7]. В дальнейшем было показано, что у больных туберкулезом детей и подростков имеются Т клетки памяти с фенотипом CD4⁺ CD45RO⁺, специфичные к *M. tuberculosis* и экспрессирующие гранулизин, при чем основным источником являются пролиферирующие Т клетки памяти с фенотипом CFSE^{low}CD4⁺CD45RO⁺ [8].

Исследования, посвященные клинической значимости содержания гранулизина в сыворотке крови при туберкулезе не многочисленны по сравнению с исследованиями различных звеньев адаптивного иммунитета. Так Sahiratmadja E. и соавт. (2007) [13] показали, что содержание сывороточного гранулизина у взрослых больных туберкулезом до начала противотуберкулезной терапии было достоверно низким по сравнению с контрольной группой. При легкой/средней выраженности туберкулезных изменений (по Международной классификации туберкулеза) его количество составляло 1,1 нг/мл (0,1–11,2) и при значительной 0,9 нг/мл (0,1–12,4), тогда как в контроле находи-

лось на уровне 2,6 нг/мл (0,2–44,6). Через 2 месяца химиотерапии показатели повышались до 2,7 нг/мл (0,3–8,5) и 2,4 нг/мл (0,3–14,50 и к окончанию лечения составляли 4,1 нг/мл (1,1–28,8) и 3,8 нг/мл (0,5–22,5), соответственно. В аналогичных исследованиях на больных туберкулезом детского возраста уровень сывороточного гранулизи́на до начала лечения составлял 0,45 нг/мл (0,33–2,98), а в контрольной группе был достоверно выше 1,4 нг/мл (0,22–6). У больных детей с отрицательным или положительным кожным тестом уровень гранулизи́на достоверно не различался и составлял 0,36 нг/мл (0,30–1,5) и 0,48 нг/мл (0,33–2,98). Не найдено статистических различий в показателях содержания сывороточного гранулизи́на в зависимости от степени выраженности изменений в легких (на основании данных рентгенографии) или между легочными и внелегочными формами туберкулеза. После 4-х месячного курса лечения уровень гранулизи́на достоверно возрастал и достигал уровня контрольной группы [6]. Изучалась антиген-стимулированная (ППД и инактивированные микобактерии H37Ra) продукция гранулизи́на в культуре мононуклеаров крови больных туберкулезом взрослого контингента больных. При этом показана незначительная стимуляция выработки гранулизи́на в культуре под воздействием указанных антигенных стимулов ($0,796 \pm 0,071$ нг/мл и $0,976 \pm 0,065$ нг/мл соответственно) по отношению к спонтанной продукции этого фактора в культуре клеток больных ($0,636 \pm 0,051$ нг/мл). Спонтанная продукция гранулизи́на в культуре мононуклеаров здоровых людей была значительно ниже ($0,262 \pm 0,076$ нг/мл) [12].

Целью нашего исследования явилось изучение уровня спонтанной и антиген-

стимулированной продукции гранулизи́на в культуре крови детей и подростков, больных деструктивным и «малыми» формами (ТВГЛУ, очаговый туберкулез) туберкулеза органов дыхания и выявление ее информативной значимости.

Материалы и методы исследования

Нами проведено исследование продукции гранулизи́на у детей и подростков больных «малыми» формами легочного туберкулеза в возрасте 5–16 лет (ТВГЛУ – человек, очаговый туберкулез – 39 человек) и деструктивными формами туберкулеза в возрасте 13–16 лет (29 человек: инфильтративный туберкулез – 18, диссеминированный туберкулез – 3, фиброзно-кавернозный туберкулез – 5, казеозная пневмония – 2, туберкулема – 1) и группы контроля (инфицированные больные или так называемый «латентный» туберкулез) в возрасте 8–14 лет (9 человек). Венозную кровь больных отбирали в пробирки с K_2EDTA и культивировали в 24-луночных культуральных планшетах (Nunc) в течение 20–22, 72 и 96 часов в смеси 1:1 с без сывороточной среды RPMI-1640, содержащей антибиотиков, L-глутамин и Нерес в стандартных концентрациях. Определение гранулизи́на проводили в плазме и супернатанте культуры крови больных до начала специфической химиотерапии методом ИФА с применением набора DouSet Elisa (cat.№ DY3138 R@D, Великобритания). Определяли спонтанную (без стимуляции антигеном – Б/АГ) и антиген стимулированную продукцию (20 мкг/мл ППД). Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета MS Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение спонтанной и АГ-стимулированной продукции гранулизи́на в культуре крови больных ($n=10$) на 1,3 и 4 сутки культивирования показало отсутствие статистически значимых различий этих показателей и для дальнейших исследований был избран срок культивирования 20–22 часов (рис. 1).

Рис. 1. Спонтанная и АГ – продуцированная выработка гранулизи́на в культуре крови больных на протяжении различных сроков культивирования

Сравнительное изучение спонтанной и антиген-стимулированной продукции гранулина больных с деструктивными формами туберкулеза (ПКТ⁺ – наличие бактериовыделения; ПКТ – отсутствие бактериовыделения) и «малыми» формами туберкулеза органов дыхания (ТВГЛУ/очаговый туберкулез) в сравнении с контрольной группой показало, что достоверное уве-

личение выработки гранулина выявлено лишь при «малых» формах туберкулеза органов дыхания (рис. 2, табл. 1).

При изучении спонтанной и антиген-стимулированной продукции гранулина в культуре крови больных с различными формами деструктивного туберкулеза не выявило различий между этими показателями (рис. 3., табл. 2).

Таблица 1

Содержание гранулина в супернатантах культуры крови детей и подростков больных различными формами туберкулеза

Культивирование	Контроль (n=9)	Деструктивный ТБ (n=29)	ТВГЛУ/Очаговый ТБ (n=39)
Спонтанная продукция	520,1 ± 80,1	553,1 ± 56,55	788,5 ± 73,8*#
АГ-стимулированная продукция	575,4 ± 75,3	721,9 ± 73	998,3 ± 94,4*##

*P – 0,0318 по сравнению с контрольной группой; **P – 0,0023 по сравнению с контрольной группой; # P – 0,015316 по сравнению с группой деструктивного туберкулеза; ## P – 0,025785 по сравнению с группой деструктивного туберкулеза.

Рис. 2. Спонтанная и антиген-стимулированная продукция гранулина у больных деструктивным туберкулезом, ТВГЛУ/очаговыми формами и контрольной группой (латентный туберкулез)

Рис. 3. Содержание гранулизина в супернатантах культуры крови детей и подростков больных различными формами деструктивного туберкулеза

Таблица 2

Содержание гранулизина в супернатантах культуры крови детей и подростков больных различными формами деструктивного и ТВГЛУ/очагового туберкулеза

	Инфильтративный ТБ	ФКТ	ТВГЛУ	Очаговый ТБ
Б/Аг	475,5± 64,5	647,1± 85,6	803,15± 84,85	562,8± 140,4
ППД	633,9± 74,1	658,8± 52,7	1013± 102,8	562,8± 249

При изучении спонтанной и антиген-стимулированной продукции гранулизина в культуре крови больных с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания

было выявлено отсутствие достоверных различий этих показателей между двумя исследованными группами (табл. 2, рис. 4).

Рис. 4. Содержание гранулизина в супернатантах культуры крови детей и подростков больных ТВГЛУ и очаговым туберкулезом

Как уже указывалось выше, в литературе есть единичное исследование антиген-стимулированной продукции гранулизины у взрослого контингента больных, где показано незначительное его превышение по сравнению со спонтанной выработкой фактора [12]. Вместе с тем, данные о выработке гранулизины в культуре клеток при различных формах деструктивного туберкулеза и «малых» формах туберкулеза органов дыхания, полученные нами, представлены впервые. Среди последних форм туберкулеза органов дыхания наиболее интересной в иммунологическом плане является туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ). Не смотря на то, что в зарубежной литературе эту форму туберкулеза крайне редко выделяют в отдельную группу, поскольку объединяют ее в группу внелегочного туберкулеза, в настоящее время накапливаются лабораторные данные, характеризующие своеобразие ТВГЛУ. Так Веуене D. и соавт. (2009) получили положительные результаты посева на микобактерии туберкулеза биоптатов внутригрудных лимфатических узлов в 69% случаев и в 95% это было подтверждено результатами ПЦР анализа [4]. В исследовании Eshete A. и соавт. (2011).

при окраске по Цилю-Нильсену парафиновых срезов биоптатов бронхопульмональных лимфузлов обнаружили кислотоустойчивыми микобактерии в 56,7% случаев [3]. При иммуногистохимическом исследовании срезов лимфоузлов больных туберкулезом было показано, что в лимфоидной ткани содержалось большое количество CD68+ зрелых макрофагов, при этом незначительно продуцирующих α -1 антитрипсин и лизоцим. В лимфоцитах и макрофагах и особенно гигантских клетках Пирогова-Лангханса был активно выражен транскрипционный фактор STAT-3, но снижены экспрессия SOCS-1 и SOCS-3, которые участвуют в регуляции активации Т-клеток и прежде всего звена Т – хелперов 1 [11]. Ранее нами было показано, что у больных с «малыми» формами показано достоверно более высокое сывороточное содержание цитокина TGF- β , основная функция которого при инфекционных процессах, в том числе и при туберкулезе, состоит в контроле за избыточной активностью CD4+ и CD8+ Т-клеток [1]. Кроме того, нами отмечена высокая продукция хемокина IP-10 в культуре крови после стимуляции ESAT6/CFP10 (1 мкг/мл) в группе ТВГЛУ/очагового туберкулеза до начала противотуберкулезной химиотерапии (в 3,7 и 1,9 раза выше, чем в группах латентного и деструктивного туберкулеза), что косвенно свидетельствует о наличии

и функциональной активности лимфоцитов, находящихся в очаге воспаления и коммитированных к основным антигенам RD1 локуса микобактерий [2]. На наш взгляд приведенные литературные сведения вместе с данными, представленными в данной работе свидетельствуют, что ТВГЛУ представляет собой иммунологически активную, сбалансированную между различными звеньями противотуберкулезного иммунитета форму туберкулеза органов дыхания, которая требует пристального внимания на предмет возможной активизации процесса даже после проведения курса противотуберкулезной химиотерапии.

Выводы

Изучение спонтанной и антиген-стимулированной продукции гранулизины в культуре крови больных выявило достоверное увеличение выработки этого фактора естественного иммунитета у больных с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания и отсутствие различий показателей между деструктивными формами туберкулеза и контрольной группой пациентов, инфицированных микобактериями туберкулеза.

В группе больных с деструктивными процессами в легких выявлена достоверно более высокая продукция гранулизины при генерализованном туберкулезе, тогда как при «малых» формах туберкулеза внутривнутригрупповые различия отсутствовали.

Изучение показателей спонтанной или антиген индуцированной продукции гранулизины в культуре крови не является достаточно информативным для оценки степени выраженности воспалительного процесса при различных формах туберкулеза.

Список литературы

1. Авербах М.М., Панова Л.В., Губкина М.Ф., Горелова Л.А. Содержание ИЛ-21 и трансформирующего фактора роста – β (TGF- β) в сыворотке детей и подростков, больных различными формами легочного туберкулеза // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 5 – С. 42–45.
2. Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф. Динамические изменения хемокина CXCL-10 (IP-10) у детей и подростков, больных различными формами туберкулеза органов дыхания // Медицинская иммунология – 2016. – Т. 18. № 3. – С. 279–286.
3. Abdurehman Eshete, Ahmed Zeyinudin, Solomon Ali, Solomon Abera, Mona Mohammed. M. tuberculosis in Lymph Node Biopsy Paraffin-Embedded Sections. Tuberculosis Research and Treatment. 2011, ID 127817. doi:10.1155/2011/127817.
4. Beyene D., Bergval I., Hailu E., Ashenafi S., Yamuah L., Aseffa A., Wiker H.G., Engers H., Klatser P., Sviland L. Identification and genotyping of the etiological agent of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia // J Infect Dev Ctries 2009, V.3, P.412–419.
5. Deng A., Chen S., Li Q., Lyu S.C., Clayberger C., Krensky A.M. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. J Immunol. 2005. V.174, P.5243–5248.

6. Di Liberto D., Buccheri S., Caccamo N., Serena Meraviglia S., Amelia Romano A., Di Carlo P., Titon L., Francesco Dieli F., Krensky A.M., Salerno A. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy // *Tuberculosis (Edinb)*. 2007, V. 87, P. 322–328.
7. Gansert J.L., Kiessler V., Engele M.e.a. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity // *J Immunol*. 2003, V.170, P.3154–3161.
8. Muelle H., Fae K.C., Magdorf M., Ganoza C.A., Wahn U., Guhlich U., Feiterna-Sperling C., Kaufmann S.H.E. Granulysin-Expressing CD4+ T Cells as Candidate Immune Marker for Tuberculosis during Childhood and Adolescence. *PLoS ONE* 2011, Volume, Issue 12, e29367.
9. Krensky A.M. Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*. 2009, V.73, P. 193–198. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01218.x.
10. Klucar P., Barnes .P.F, Kong Y., et al. Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum Immunol*. 2008, V.69, P.475–483.
11. Nicol A.F., Nuovo G.J., Coelho J.M.C., Rolla V.C., Horn C. SOCS in situ expression in tuberculous lymphadenitis in an endemic area. *Experimental and Molecular Pathology* 2008. V.84, P. 240–244.
12. Pitabut N., Mahasirimongkol S., Yanai H., Ridruechai C., Sakurada S., Dhepakson P., Kantipong P., Piyaworawong S., Moolphate S., Hansudewechakul C., Yamada N., Keicho N., Okada M., Khusmith S. Decreased plasma granulysin and increased interferon-gamma concentrations in patients with newly diagnosed and relapsed tuberculosis. *Microbiol Immunol* 2011, V.55, P. 565–573.
13. Sahiratmadjaa E., Alisjahbanad B., Buccherie S., Di Liberto D., de Boera T., Adnanc I., van Crevelf R., Kleina M.R., van Meijgaarden K.E., Nelwang R.H.H., van de Vosseb E., Dielie F., T.H.M. Ottenhoffa T.H.M. Plasma granulysin levels and cellular interferon- γ production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon- γ levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis* 2007, V. 87, P.312–321.
14. Stenger S., Hanson D.A., Teitelbaum R., et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998; 282:121–125.; Krensky A.M. Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*. 2009, V.73, P. 193–198.