

УДК 616.24-002.5-036.17

СОДЕРЖАНИЕ ИЛ-21 И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА – β (TGF- β) В СЫВОРОТКЕ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛЕГОЧНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

Авербах М.М., Панова Л.В., Губкина М.Ф., Горелова Л.А.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,
Москва, e-mail: amm50@mail.ru

Проведен анализ выработки TGF- β и ИЛ-21 у 33 детей и подростков больных различными формами туберкулеза легких. Показано достоверное снижение концентрации TGF- β сыворотки крови детей и подростков, больных деструктивными по сравнению с очаговыми формами туберкулеза и туберкулезом внутригрудных лимфоузлов. Выявлено, что у детей и подростков отсутствует сколько-нибудь значимая продукция ИЛ-21 при «малых» формах (ТВГЛУ и очаговый туберкулез) по сравнению с деструктивными формами и латентной формой туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, дети, подростки, трансформирующий фактор роста β , интерлейкин 21

THE SERUM LEVEL OF INTERLEUKIN 21 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β IN CHILDREN AND TEENAGERS WITH VARIOUS FORM OF LUNG TUBERCULOSIS

Averbah M.M., Panova L.V., Gubkina M.F., Gorelova L.A.

Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, e-mail: amm50@mail.ru

The level of production of TGF- β and IL-21 was determined in 33 children and teenagers with various forms of pulmonary tuberculosis. Significant decrease in the concentration of serum TGF- β have shown in children and teenagers with destructive tuberculosis in contrast to focal tuberculosis and tuberculosis of intrathoracic lymph nodes. It was found that in children and teenagers is not any significant production of IL-21 at the «small» forms (intrathoracic lymph nodes and focal tuberculosis) compared to destructive forms and latent TB.

Keywords: tuberculosis, children, teenagers, transforming growth factor- β , interleukin 21

В подавляющем числе отечественных и зарубежных работ по изучению цитокинового профиля детей, больных различными формами легочного туберкулеза, внимание исследователей было сосредоточено на группе провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α и ИНФ- γ) [2]. Лишь в единичных исследованиях изучались группа цитокинов, продуцируемых субпопуляцией Т клеток Тх17 (ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-23 и ИЛ-6) и регуляторные цитокины (ИЛ-10 и TGF- β). ИЛ-21 относится к группе цитокинов I типа, в которую входят еще ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9 и ИЛ-15. В составе клеточных рецепторов для каждого из этой группы цитокинов имеются одна общая γ цепь (γ c). ИЛ-21 продуцируется в основном НКТ и различными субпопуляциями CD4+ Т клеток и оказывает плеiotропный эффект на врожденный и адаптивный иммунный ответ в виде усиления пролиферации лимфоидных клеток, усиления цитотоксичности CD8+ Т клеток и натуральных киллеров (НК) и дифференцировки В лимфоцитов в плазматические клетки [8]. К настоящему моменту основная масса исследований о роли ИЛ-21 в иммунологическом ответе была сосредоточена в области противоопухолевого иммунитета, где в опытах *in vitro* и *in vivo* показана его потенциальная

иммунотерапевтическая активность для подавления роста меланомы и фибросаркомы посредством активизации в основном цитотоксической активности CD8+ Т клеток и натуральных киллеров (НК) [10]. Кроме того, на моделях аутоиммунных заболеваний у мышей (коллаген-индуцированный артрит и экспериментальный аллергический энцефаломиелит) показана роль ИЛ-21 в усилении хронической воспалительной реакции тканей. Введение моноклональных антител к рецептору ИЛ-21 приводило к значительной выраженности воспалительного процесса [9]. Уровень содержания в сыворотке и антиген стимулированная продукция ИЛ-21 при различных формах туберкулеза у больных детей и подростков и взрослого контингента находится на начальном этапе исследования. В единственном исследовании по определению уровня цитокинов в крови детей и подростков больных легочным туберкулезом в сравнении с внелегочным туберкулезом и группой контактирующих с больными туберкулезом показано достоверное повышение содержания ИЛ-21 в плазме крови (13,8 пг/мл, 10,4 пг/мл и 6,15 пг/мл соответственно) [6]. Трансформирующий фактор роста – β (TGF- β) принадлежит к TGF- β суперсе-

мейству, состоящему из 38 ростковых и дифференцировочных факторов, и имеет 3 изоформы (TGFβ 1, 2 и 3). TGF-β играет значительную роль в развитии и гомеостазе различных тканей и особенно в контроле клеточной пролиферации [7]. По современным представлениям при инфекционном и процессах, в том числе туберкулезе, TGF-β и IL-10 подавляют избыточный воспалительный процесс посредством регуляции эффекторных Т клеток. TGF-β выделяется в основном субпопуляциями регуляторных Т клеток с фенотипом CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg, и CD8 + Treg, которые корректируют функцию соответственно CD4 + и CD8 + Т клеток при различных патологических процессах [4]. Субпопуляция клеток с фенотипом CD4 (+) CD25 (+) FoxP3 (+) Treg подавляет эффекторные функции CD4 + Т – клеток индуцирует диссеминацию микобактерий, что усугубляет проявления заболевания. Кроме того, при активной стадии туберкулеза выявлен высокий процент CD4 + Т клеток с фенотипом CD4 (+) CD25 (high) CD39 (+), обладающая модулирующей функцией [3]. Изучение уровня TGF-β при туберкулезе у взрослого контингента больных выявило устойчивую тенденцию к его увеличению по мере возрастания тяжести процесса. Данные по уровню спонтанной и антиген стимулированной продукции TGF-β у детей и подростков противоречивы. Показано, как достоверное увеличение продукции этого цитокина у больных детей и подростков по сравнению больными латентным туберкулезом [5], так и отсутствие подобных различий [6]. Структура заболеваемости туберкулезом детей и подростков отличается от взрослого контингента больных и достаточно высока доля «малых» форм туберкулеза (ТВГЛУ – туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, и очаговый туберкулез составляют 35–40%), а остальное составляют деструктивные и диссеминированные формы [1]. Это предполагает наличие различий в регуляторных механизмах функции Т клеток-эффекторов противотуберкулезного иммунитета. Целью настоящего исследования явилось определение выработки ИЛ-21 и TGF-β у детей и подростков с различными формами легочного туберкулеза до начала проведения противотуберкулезной химиотерапии.

Материалы и методы исследования

Нами проведено исследование продукции TGF-β и ИЛ-21 у 33 детей и подростков больных «малыми» формами легочного туберкулеза в возрасте 5–16 лет (ТВГЛУ – 10 человек, очаговый туберкулез – 10 человек) и деструктивными формами туберкулеза

в возрасте 13–16 лет (инfiltrативный туберкулез с распадом – 7 человек, диссеминированный туберкулез с распадом – 4 человека и туберкулема легких в фазе распада и обсеменения – 2 человека) и группы контактов с больными туберкулезом (латентный туберкулез) в возрасте 8–14 лет (5 человек). Венозную кровь больных отбирали в пробирки с K₃ЭДТА и культивировали в 24-луночных культуральных планшетах (Nunc) в течение 18–20 часов в смеси 1:1 с без сывороточной среды RPMI-1640, содержащей антибиотики, L-глутамин и Нерес в стандартных концентрациях. Определение TGF-β проводили в сыворотке крови, а ИЛ-21 в супернатанте культуры крови больных до начала специфической химиотерапии и в течение интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии (группы больных с деструктивным туберкулезом) методом ИФА с применением ИФА наборов (R@D, Великобритания). Определяли спонтанную (без стимуляции антигеном – Б/АГ) и антиген стимулированную продукцию (30 мкг/мл ультразвуковой дезинтеграт M. Tuberculosis H37Rv – УЗД). Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета MS Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Показано, что показатели уровня сывороточного TGF-β в группе контактов составили $1178,7 \pm 353,3$ пг/мл, у больных ТВГЛУ $1401,72 \pm 164,3$ пг/мл, у больных очаговым туберкулезом $1231,64 \pm 107,7$ пг/мл и деструктивными формами $831,4 \pm 100,9$ пг/мл. То есть у больных деструктивными формами туберкулеза уровень сывороточного TGF-β был достоверно ниже по сравнению с уровнем при «малых» формах туберкулеза ($P \leq 0,05$). Результаты представлены на рис. 1.

Концентрация ИЛ-21 в плазме 1-дневной культуры крови в группах больных латентным туберкулезом, деструктивными и «малыми формами» туберкулеза составили $120,8 \pm 31,65$ пг/мл, $80,6 \pm 29,0$ пг/мл и $18,7 \pm 10,1$ пг/мл соответственно. Различий между спонтанной и антиген стимулированной продукцией ИЛ-21 в этих группах не выявлено (рис. 2).

Следует отметить, что в группах больных с «малыми» формами туберкулеза концентрация ИЛ-21 лишь в 10% случаев превышала границу чувствительности метода (16 пг/мл), т.е. практически отсутствовала. Эта тенденция имела место как до начала лечения, так и через 3 и 6 месяцев после проведения противотуберкулезной химиотерапии.

Результаты продукции ИЛ-21 в плазме 1-дневной культуры крови в группе больных с деструктивными формами туберкулеза представлены на рис. 3. Уровень спонтанной продукции ИЛ-21 не менялась в течение 3 месяцев интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии. Показатели антиген стимулированной продукции

изменялись в течении 1-го и 2-го месяцев наблюдения, но степень достоверности результатов требует дальнейшего подтверждения, поскольку имелись значительные колебания индивидуальных показателей (0 мес. $95,1 \pm 35,9$ пг/мл; 1 мес. $326,8 \pm 125,7$ пг/мл; 2 мес. $93,4 \pm 40,6$ пг/мл).

Как видно из представленных результатов, нами не найдены различия в уровнях спонтанной продукции TGF- β между группой контактов и больными с ТВГЛУ и очаговым туберкулезом. Полученные нами данные расходятся с ранее проведенными зарубежными исследованиями на больных туберкулезом детей и подростках. Это вероятно может быть связано различиями в формировании групп исследований, поскольку больные туберкулезом в нашей работе были подразделены по формам туберкулезного процесса, а зарубежных исследований чаще объединяются в группы активного и латентного туберкулеза [5]. Кроме того,

расхождение данных по содержанию TGF- β в сыворотке могут быть связаны с различием методик его определения. Мы использовали метод ИФА, в котором согласно инструкции производителя TGF- β , содержащейся в сыворотке в связанном виде, вначале переводится в активное состояние. В работе, использовавшей метод мультиплексного анализа [6] этот этап согласно методике отсутствует, что предполагает использование детектирующих антител, направленных к различным эпитомам этого цитокина. Поскольку процесс активации через различные протеазы (матриксметаллопротеазы 2 и 9, плазмин, калекреин) весьма важен для проявления функции TGF- β , определение его активированных форм более предпочтительно. Большинство эффектов активации TGF- β этими веществами показано *in vitro* и нуждается в дальнейшем изучении на уровне организма в условиях патологических процессов [7].

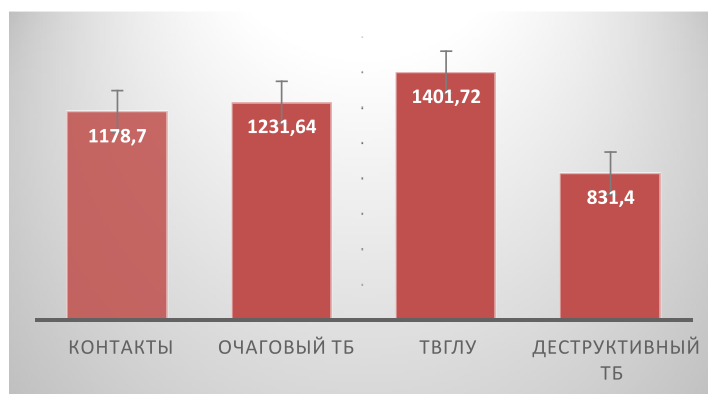


Рис. 1. Уровень сывороточного TGF- β (указано M в пг/мл) при различных формах туберкулеза детей и подростков до начала противотуберкулезной химиотерапии

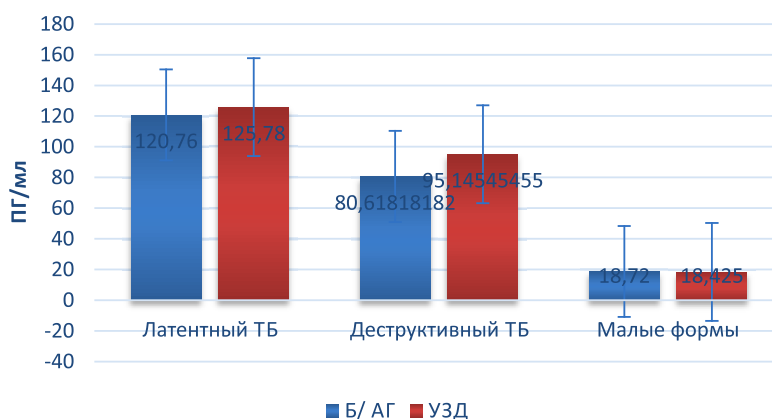


Рис. 2. Уровень спонтанной и антиген стимулированной продукции ИЛ-21 (указано M в пг/мл) в группах больных латентным туберкулезом, деструктивными и «малыми формами» туберкулеза до начала противотуберкулезной химиотерапии

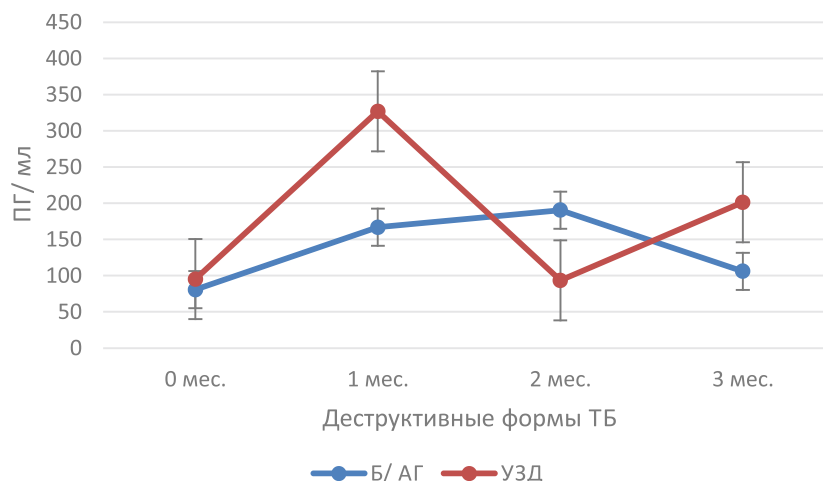


Рис. 3. Уровень спонтанной (Б/АГ) и антиген стимулированной (УЗД) продукции ИЛ-21 в группе больных деструктивными формами туберкулеза в течение интенсивной фазы химиотерапии

Данные о роли ИЛ-21 в процессах активации В лимфоцитов и их дифференцировки в плазматические клетки, поляризации дифференцировки CD4 + лимфоцитов преимущественно в сторону субпопуляции T_H1 и T_H17, регуляции функции CD8 + Т лимфоцитов и NK клеток также получены в основном *in vitro* и на экспериментальных мышах с генетическим дефектом, обуславливающим отсутствие на лимфоидных клетках рецептора к ИЛ-21 [8]. Полученные нами данные о динамике продукции ИЛ-21 при различных формах легочного туберкулеза ранее нигде не публиковались.

Выводы

1. Показано достоверное снижение концентрации TGF- β сыворотки крови детей и подростков, больных деструктивными формами по сравнению с «малыми формами» туберкулеза, что может свидетельствовать в пользу снижения регуляторного влияния этого цитокина прежде всего на звено специфического клеточного иммунитета при распространенных туберкулезных процессах.

2. Показано, что у детей и подростков отсутствует сколько-нибудь значимая продукция ИЛ-21 при «малых» формах (ТВГЛУ и очаговый туберкулез) по сравнению с де-

структивными формами легочного туберкулеза и латентной формой туберкулеза.

Список литературы

1. Аксенова В.А. Туберкулез у детей и подростков // «ГЭОТАР-Медиа», 2007. – 272 с.
2. Васильева И.А., Вербов В.Н., Ивановский В.Б., Жемкова М.Ф., Никитина И.Ю., Лядова И.В., Тотолян А.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 4. – С. 77–85.
3. Chiacchio T., Casetti R., Butera O., Vanini V., Carrara S., Giardi E., Dim Mitri D., Battistini L., Martini F., Borselli G., Golletti D. // Clin. Exp. Immunol. – 2009. – V. 156. – P. 463–470.
4. Dorhoi A., Kaufmann S.H.E. Fine-tuning of T cell responses during infection // Curr. Opin. Immunol. – 2009. – V. 21. – P. 367–377.
5. Lighter-Fisher J., Peng C-H., Tse D.B. Cytokine responses to QuantiFERON® peptides, purified protein derivative and recombinant ESAT-6 in children with tuberculosis // Int J Tuberc Lung Dis. – 2010. – V. 14. – P. 1548–1555.
6. Pavan N., Kumar S., Amerada R., Suresh R., Ganesh R., Shankar J., Kumaraswami V., Nutman T.B., Babu S. // Clin Vaccine Immunol. – 2011. – V. 18. – P. 1856–1864.
7. Robertson I.B., Rifkin D.B. Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGF β secretion, sequestration, and activation // Cytokine Growth Factor Rev. – 2013. – V. 24. – P. 355–372.
8. Spolski R., Leonard W.J. Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity // Annu. Rev. Immunol. – 2008. – V. 26. – P. 57–79.
9. Young D.A., Hegen M., Ma H.L., Whitters M.J., Albert L.M., Lowe L., Senices M., Wu P.W., Silley B., Leathurby Y., Brow T.P., Necherson-Nutter C., Keith J.C., Collins M. // Arthritis Rheum. – 2007. – V. 56. – P.1152–1163.
10. Wang G., Tsohi M., Spolski R., Lou Y., Ozaki K., fenq C., Kim G., Leonard W.J., Hwu P. // Cancer Res. – 2003. – V. 63. – P.9016–9022.