

УДК 616.24-002.5-036.17-053

## ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРФОРИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

**Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф., Горелова Л.А., Евсеева Н.И.**  
ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, e-mail: amm50@mail.ru

Исследовали динамику содержания в плазме цитолитической молекулы перфорина методом иммуноферментного анализа. Анализ проведен у 49 больных с деструктивными формами ( $n = 13$ ) и ТВГЛУ/очаговыми формами туберкулеза ( $n = 27$ ). Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов, имевших контакт с больными туберкулезом и положительные кожные пробы. При деструктивных формах туберкулеза до начала химиотерапии выявлено достоверно низкое содержание перфорина по сравнению с группой инфицированных пациентов ( $34,15 \pm 1,5$  нг/мл и  $39,5 \pm 1,1$  нг/мл соответственно,  $p = 0,01366$ ) и больных с ТВГЛУ/очаговым туберкулезом ( $38,7 \pm 0,78$  нг/мл и  $34,15 \pm 1,5$  нг/мл соответственно,  $p = 0,01712$ ). В процессе лечения концентрация перфорина плазмы крови практически не изменялись как у больных деструктивным туберкулезом, так и при ТВГЛУ/очаговых формах туберкулеза. Однако уровень перфорина у больных с деструктивным туберкулезом по сравнению с «малыми» формами был достоверно ниже во все сроки наблюдения (0 мес. –  $p = 0,01711$ ; 3 мес. –  $p = 0,00139$  и 6 мес. –  $p = 0,00054$ ). Полученные результаты указывают на значимость выработки перфорина при «малых» формах туберкулеза.

**Ключевые слова:** туберкулез, дети, подростки, перфорин

## DYNAMIC CHANGES OF PERFORIN OF BLOOD PLASMA IN CHILDREN AND ADOLESCENTS, PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF TUBERCULOSIS OF BREATH ORGANS

**Averbakh M.M. (jr.), Panova L.V., Gubkina M.F., Gorelova L.A., Evseeva N.I.**  
Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, e-mail: amm50@mail.ru

The dynamics plasma changes of the cytolytic molecule perforin was evaluated by the enzyme immunoassay method. The analysis was carried out in 49 patients with destructive forms ( $n = 13$ ) and TBLN / focal forms of tuberculosis ( $n = 27$ ). The MTB infected group was consisted of 9 patients who had contact with patients with tuberculosis and positive skin tests. The destructive tuberculosis forms before the starting of chemotherapy has the significantly low content of perforin in comparison with the group of infected patients ( $34.15 \pm 1.5$  ng / ml and  $39.5 \pm 1.1$  ng / ml, respectively,  $p = 0.01366$ ) and with TBGH / focal tuberculosis ( $38.7 \pm 0.78$  ng / ml and  $34.15 \pm 1.5$  ng / ml, respectively,  $p = 0.01712$ ). During treatment course the concentration of plasma perforin practically did not change in patients with destructive tuberculosis, or in TBHL / focal forms of tuberculosis. However, the perforin level in patients with destructive tuberculosis was significantly lower in comparison with the «small» forms at all observation times (0 months –  $p = 0.01711$ , 3 months –  $p = 0.00139$  and 6 months –  $p = 0,00054$ ). The obtained results indicate on the importance of perforin production in «small» forms of tuberculosis.

**Keywords:** tuberculosis, children, adolescents, perforin

Перфорин наряду с гранзимами А и В относится к семейству литических протеинов, которые содержатся в секреторных ацидофильных гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клетках и способны лизировать опухолевые клетки и внутриклеточно располагающиеся вирусы и микроорганизмы, такие как *Mycobacteria*, *Brucella*. Перфорин имеет молекулярную массу 67-kDa. Он активируется посредством расщепления С-конца в его структуре и способствует проникновению гранзимов А и В через цитоплазматическую мембрану. Существует представление, что гранзимы переносятся через плазматическую мембрану через специфический рецептор: катион-независимый маннозо-6-фосфатный рецептор и перфорин приводит гранзимы к конкретным активным участкам цитоплазматической мембраны. В опосредованном

перфорин/гранзимы пути апоптотической гибели клеток-мишеней важную роль играет сериновая протеаза серглицин (SG). Он является протеогликаном, в котором хондроитинсульфаты или гепарансульфатгликозаминогликаны (GAG связаны с Ser-Gly-повторами в центральную часть основного белка. Считается, что отрицательно заряженные цепи GAG способствуют сохранению гранзимов А и В в виде мультимерных комплексов и, как было показано, гранзим В секретируется в форме, связанной с серглицином. В свою очередь перфорин способствует эффективной доставке комплексов гранзим В – серглицин в цитозоль клеток-мишеней путем пермеабилзации. Полноценность этого процесса зависит от ионов  $Ca^{2+}$  [1].

Цитотоксический ответ против различных клеток-мишеней, в том числе и макро-

фагов, инфицированных микобактериями, осуществляется различными субпопуляциями клеток. Они представлены небольшой популяцией МНС – не рестриктированных  $\gamma\delta$  Т (CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>) клетками, имеющими еще дополнительные фенотипические маркеры CD56<sup>+</sup> и/или CD16<sup>+</sup>. Другой более важной популяцией цитотоксических лимфоцитов являются МНС-I рестриктированные CD8<sup>+</sup> и МНС-II рестриктированные CD4<sup>+</sup> цитотоксические субпопуляции Т-клеток. Третью популяцию представляют НК-клетки. Цитотоксический эффект двух последних групп клеток осуществляется комплексом цитолитических молекул после контакта с опухолевыми клетками, клетками, инфицированными вирусами, или макрофагами, содержащими микроорганизмы (в том числе с микобактериями). НК-клетки после контакта с мишенями усиливают продукцию и выделение во внутриклеточную среду перфорина, гранзима А и гранулизина, которые связываются непосредственно с клетками-мишенями через образованные нанотрубчатые структуры и посредством мембрана-атакующего комплекса лизируют мишени, подобно С9 компоненту комплемента. Описана мутация молекулы перфорина Ala91Va, которая приводит к низкой стабильности молекулы и развитию различных типов опухолей, таких как В-клетки и Т-клеточные лимфомы и острый лимфобластный лейкоз у детей [2].

Способность цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов лизировать внутриклеточные микроорганизмы зависит от их способности привлекать инфицированные клетки, а также от секреции цитолитических и антимикробных эффекторных молекул (хемокина CCL5, перфорина и гранулизина). Макрофаги, инфицированные вирулентными *Mycobacterium tuberculosis*, вызывают экспрессию CCL5 только у CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, сенсibilизированных к антигенам микобактерий. Функционально CCL5 эффективно привлекает *M. tuberculosis* инфицированные макрофаги, но не оказывает прямой антибактериальной активности. Зараженные макрофаги также вызывают экспрессию гранулизина в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом гранулин обладает высокой активностью в отношении *M. tuberculosis*, как чувствительных, так и резистентных к лекарственным средствам клинических изолятов. Подавляющее большинство CCL5-позитивных клеток CD8<sup>+</sup> лимфоцитов являются также продуцентами перфорина [3].

Исследования о роли перфорина при туберкулезе не многочисленны. Так показа-

но, что у больных с активным туберкулезом легких наряду с достоверным снижением в крови общего количества лимфоцитов и их супопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> наблюдается значительный подъем CD8<sup>+</sup> клеток, содержащих внутриклеточно выявляемый перфорин, в сравнении с группой здорового контроля, что предполагает усиление цитолитической активности CD8<sup>+</sup> клеток у больных туберкулезом [4].

S. Rahman и соавт. (2009) [5] изучали биоптаты лимфатических узлов детей, больных туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов, которых на основании *in situ* ПЦР-анализа на антигены микобактерий разбили на группы ТБ<sup>+</sup> и ТБ<sup>-</sup>. Методом иммунофлюоресценции у больных ТБ<sup>+</sup> не выявлено увеличение пропорции CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток, но содержание CD8<sup>+</sup> Т-клеток было достоверно выше, чем в биоптатах у ТБ<sup>-</sup> больных.

Кроме того показано, что индукция таких важных при туберкулезе цитокинов, как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , была низкой, а IL-17 незначительной в случаях ТБ<sup>+</sup> лимфаденита по сравнению с контрольной группой (срезы лимфоидной ткани глоточного кольца). Более того, в то время как экспрессия мРНК гранзима А была значительно увеличена, экспрессия перфорина, и гранулизина оставались низкими при ТБ<sup>+</sup> лимфадените. Напротив, экспрессия всех цитолитических эффекторных молекул была значительно выше в ТБ – лимфадените. При этом CD8<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие гранзим А, перфорин и гранулин располагались в основном в паракортикальных слоях лимфоузлов. Отмечено также, что избыточное накопление регуляторных Т-клеток, экспрессирующих мРНК для FoxP3, TGF- $\beta$  и IL-13, но не IL-10 и IL-4, обратно коррелирует с накоплением CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Описана значимость некоторых аллелей главного комплекса гистосовместимости на содержание перфорин-положительных CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> клеток в периферической крови. Типирование с помощью ПЦР на основе специфических олигонуклеотидных последовательностей для аллелей HLA-DR2 у 156 здоровых доноров и 102 больных легочным туберкулезом показало значительное снижение общего числа перфорин-положительных клеток, а также CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> клеток у HLA-DR2-позитивных больных туберкулезом по сравнению с HLA-DR2 – отрицательными больными туберкулезом. При этом процент перфорин-положительных CD8<sup>+</sup> клеток не отличался у DRB1\*1501 и DRB1\*1502 больных. Однако выявлено снижение процента перфорин-положи-

тельных CD16+ и CD56+ клеток у больных, несущих аллель DRB1\*1501, по сравнению с больными с аллелью DRB1\*1502. Авторы предполагают наличие ассоциации между HLA-DR2 и снижением перфорин-положительных цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров у больных туберкулезом [6].

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 49 больных, разделенных на три группы. В группу больных с деструктивным туберкулезом включено 13 человек в возрасте от 14 до 17 лет. Инфильтративный туберкулез в фазе распада и обсеменения диагностирован у 6 человек, диссеминированный туберкулез в фазе распада – у 3 человек, множественные туберкулемы в фазе распада и обсеменения – у 2 человек, фиброзно-кавернозный туберкулез – 1 человек и казеозная пневмония – 1 человек.

В исследование включено 27 больных в возрасте от 3 до 16 лет с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) диагностирован у 14 человек, в том числе с очагами отсева в легочную ткань – 5 человек; очаговый туберкулез легких – 13 человек. Большинство процессов были выявлены в фазе начинающейся кальцинации – 12 чел. и реже в фазе уплотнения – 10 чел., и в фазе инфильтрации – 5 чел.

Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов в возрасте от 5 до 14 лет, обратившихся по поводу контакта с больными туберкулезом и имевших положительные реакции пробу Манту с 2 ТЕ и Диаскинтест.

Перфорин-1 определяли в К<sub>2</sub>ЭДТА плазме методом иммуноферментного анализа с помощью набора SEB317Hu (Cloud-Clone Corp.) согласно инструкции изготовителя. Диапазон определения тест-системы 1,56–100 нг/мл, минимальная определяемая концентрация 0,62 нг/мл. Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета Microsoft Excel.

### Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение результатов содержания перфорина в плазме крови группы инфицированных пациентов и больных деструктивными и «малыми» формами туберкуле-

за до начала курса противотуберкулезной химиотерапии выявило, что при деструктивных формах туберкулеза имеется достоверно более низкое содержание этого фактора по сравнению с группой инфицированных МБТ пациентов ( $34,15 \pm 1,5$  нг/мл и  $39,5 \pm 1,1$  нг/мл соответственно,  $p = 0,01366$ ). У больных с ТВГЛУ/очаговым туберкулезом содержание перфорина было достоверно выше, чем при деструктивных формах поражения легких ( $38,7 \pm 0,78$  нг/мл и  $34,15 \pm 1,5$  нг/мл соответственно,  $p = 0,01712$ ) (таблица, рис. 1).

В процессе лечения значения перфорина плазмы крови практически не изменялись как у больных деструктивным туберкулезом, так и при ТВГЛУ/очаговых формах туберкулеза (рис. 2, таблица). Однако уровень перфорина у больных с деструктивным туберкулезом по сравнению с «малыми» формами был достоверно ниже во все сроки наблюдения (0 мес. –  $p = 0,01712$ ; 3 мес. –  $p = 0,00139$  и 6 мес.  $p = 0,00055$ ). При рассмотрении динамики содержания перфорина у больных «малыми» формами туберкулеза, подразделенными на подгруппы ТВГЛУ и очагового туберкулеза нами были выявлены некоторые особенности динамики этого фактора. Если у больных ТВГЛУ показатели оставались неизменными в процессе всех сроков исследования, то у больных очаговыми формами наблюдался временный подъем концентрации перфорина на срок 3 мес. ( $38,05 \pm 1,05$  нг/мл и  $42,15 \pm 1,3$  нг/мл соответственно,  $p = 0,05071$ ) (рис. 3). При этом показатель достигал уровня группы инфицированных МБТ. Следует также отметить, что содержание перфорина в группе ТВГЛУ/очаговый туберкулез сравнимы с аналогичным показателем группы инфицированных МБТ, что предполагает более эффективное функционирование этого звена противотуберкулезного иммунитета.

Концентрация перфорина (в нг/мл) плазмы крови больных исследованных групп

Группы наблюдения	Срок исследования		
	0 мес.	3 мес.	6 мес.
Деструктивный ТБ	$34,15 \pm 1,5$ *^	$32,6 \pm 0,38$ **	$31,35 \pm 0,19$ ***
ТВГЛУ/очаговый ТБ	$38,7 \pm 0,78$ **	$40,3 \pm 1,62$	$39,3 \pm 1,7$
Инфицированные МБТ	$39,5 \pm 1,1$	–	–

Примечания: ^P = 0,01366 по сравнению с группой инфицированных МБТ; \*P = 0,01712 по сравнению с группой ТВГЛУ/очаговый ТБ; \*\*P = 0,001139 по сравнению с группой ТВГЛУ/очаговый ТБ; \*\*\*P = 0,00055 по сравнению с группой ТВГЛУ/очаговый ТБ.

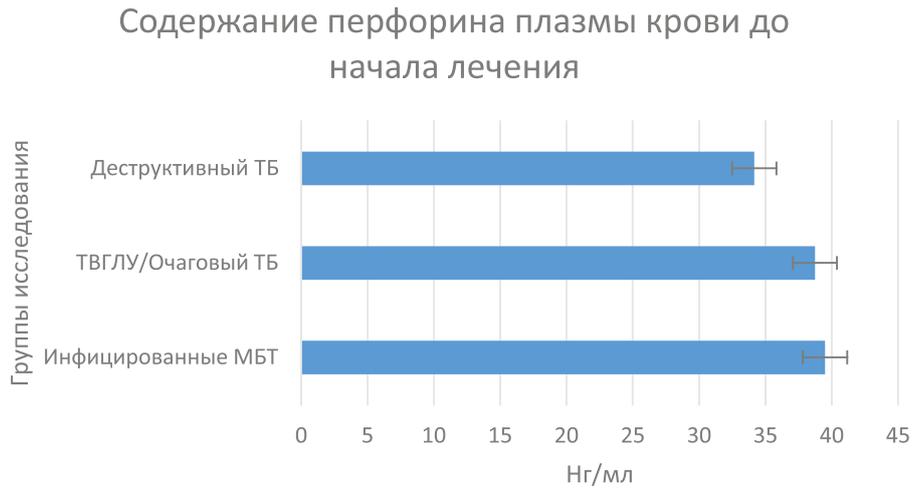


Рис. 1. Содержание перфорина плазмы крови у больных исследованных групп до начала курса химиотерапии

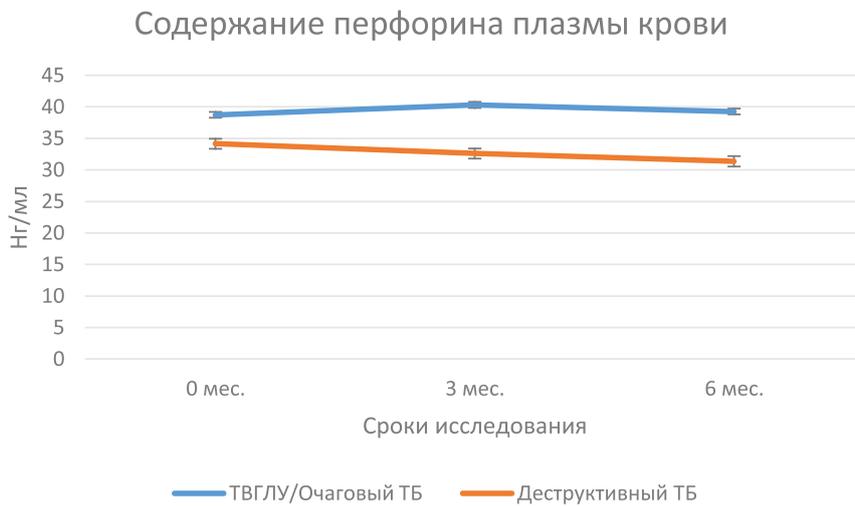


Рис. 2. Динамические изменения перфорина плазмы крови при проведении противотуберкулезной химиотерапии

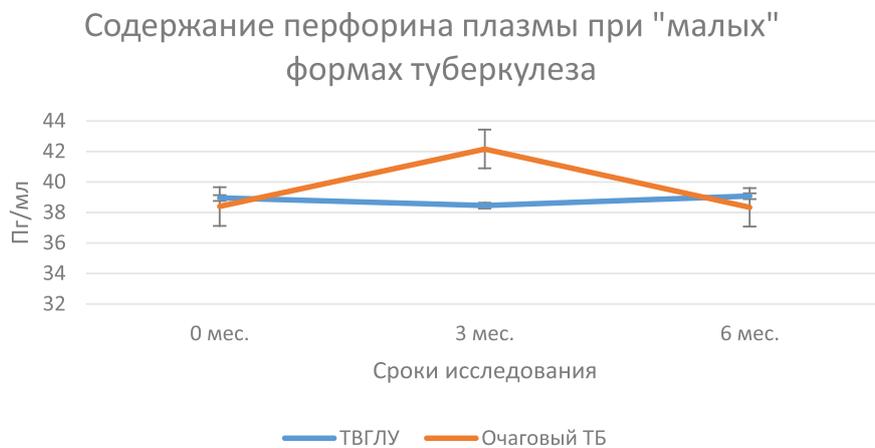


Рис. 3. Динамические изменения перфорина плазмы крови при проведении противотуберкулезной химиотерапии у больных ТВГЛУ и очаговыми формами туберкулеза

Данные о содержании в крови больных легочным туберкулезом CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, в том числе и продуцирующих цитолитические молекулы, достаточно противоречивы. Если при деструктивных формах туберкулеза отмечено достоверное снижение этих субпопуляций лимфоцитов по сравнению со здоровыми индивидами [4], то для больных туберкулезным поражением лимфоузлов такие данные отсутствуют. Методом ПЦР в реальном времени показано отсутствие различий уровня экспрессии CD4 мРНК и увеличение для CD8 мРНК *in situ* в ткани лимфоузлов положительных и отрицательных по наличию ДНК микобактерий по сравнению с тканью здоровых миндалин человека. Кроме того, этим же методом показано преобладание мРНК гранзима А, перфорина и гранулизына в ткани лимфоузлов больных туберкулезом отрицательных по обнаружению микобактерий туберкулеза по сравнению с биоптатами, где микобактерии были выявлены [7]. То есть отсутствие или временные колебания количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в крови можно объяснить явлениями компартментализации иммунного ответа в пользу очага воспаления. Повышение уровня перфорина в плазме крови у больных «малыми» формами туберкулеза может зависеть от аллельного полиморфизма локуса HLA-DR2 и, в частности, от отсутствия у больных с этими формами туберкулеза аллели DRB1\*1501, что не приводит к снижению процента перфорин-положительных CD16<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> [6]. Повышенный уровень перфорина плазмы также может отражать проявление аутокринного механизма, который регулирует баланс потребности в цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитах на поздних стадиях иммунного ответа [8]. Представленные нами

данные о различиях и динамике изменений содержания перфорина в плазме больных деструктивными и «малыми» формами туберкулеза, вероятно, отражают баланс потребности в цитотоксических CD8<sup>+</sup> лимфоцитах на различных стадиях этих форм туберкулезного процесса.

#### Список литературы

1. Kondos S. C., Hatfaludi T., Voskoboinik I., Trapani J.A., Law A.H.P., Whisstock J.C., Dunstone M.A. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins // *Tissue Antigens*. – 2010. – V. 76. – P. 341–351.
2. Lu C.C., Wu T.S., Ya-Jing Hsu Y.J., Chang C.J., Lin C.S., Chia J.H., Huang T.T., Martel J., Ojcius D.M., Young J.D., Lai H.C. NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2014. – V. 96. – P. 1–11.
3. Voskoboinik I., Dunstone M.A., Baran K., Whisstock J.C., Trapani J.A. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology // *Immunol. Rev.* – 2010. – V. 235. – P. 35–54.
4. Rozot V., Vigano S., Mazza-Stalder J., Idrizi E., Day C.L., Perreau M., Lazor-Blanchet C., Petruccioli E., Hanekom W., Goletti D., Bart P.A., Nicod L., Pantaleo G., Harari A. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8<sup>+</sup> T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease // *Eur. J. Immunol.* – 2013. – V. 43. – P. 1568–1577.
5. Rahman S., Gudetta B., Fink J., Granath A., Ashenafi S., Aseffa A., Derbew M., Svensson M., Andersson J., Grundström Brighenti S. Few CD8<sup>+</sup> Effector T Cells but Elevated Levels of FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in the Granulomatous Lesions // *Am. J. Pathol.* – 2009. – V. 174. – P. 2211–2224.
6. Rajeswari D. N., Selvaraj P., Raghavan S., Jawahar M.S., Narayanan P.R. Influence of HLA-DR2 on perforin-positive cells in pulmonary tuberculosis // *International Journal of Immunogenetics*. – 2007. – V. 34. – P. 379–384.
7. Lu C.C., Wu T.S., Hsu Y.J., Chang C.J., Lin C.S., Chia J.H., Wu T.L., Huang T.T., Jan Martel, Ojcius D.M., Young J.D., Lai H.C. NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2014. – V. 96. – P. 1–11.
8. Woodworth J.S., Wu Y., Behar S.M. Mycobacterium tuberculosis-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Require Perforin to Kill Target Cells and Provide Protection In Vivo // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181. – P. 8595–8603.