



Л. П. ТИТОВ, А. Е. ГОНЧАРОВ, Е. М. СКРЯГИНА,
Н. С. ШПАКОВСКАЯ, Н. П. АНТОНОВА,
О. М. ЗАЛУЦКАЯ, Т. С. НОВОХАТЬКО

ИММУНОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ НАНОВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОЦИТАРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава
Республики Беларусь, РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии

Цель исследования. Разработать метод адъювантной иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом на основе зрелых аутологичных моноцитарных дендритных клеток, праймированных антигенами микобактерий. Оценить его безопасность, иммунофизиологическую и клиническую эффективность.

Материал и методы. Обследованы 26 пациентов с множественно-лекарственно-устойчивым туберкулезом. Из моноцитов периферической крови 13 пациентов (опытная группа) получали культуры дендритных клеток, которые праймировали лизатом аутоштаммов микобактерий и вводили в 3 этапа под кожу медиальной поверхности предплечья. Исследовали клинико-лабораторные показатели и состояние системы иммунитета до и после терапии. Контрольную группу составили 13 пациентов, получавших химиотерапию в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Результаты. Отмечена удовлетворительная переносимость и безопасность предложенного способа иммунотерапии. Установлено, что сочетание стандартной схемы химиотерапии множественно-лекарственно-устойчивого туберкулеза с применением дендритных клеток способствовало снижению массивности бактериовыделения, положительной рентгенологической динамике. У больных после терапии дендритными клетками установлена тенденция к нормализации индекса CD4/CD8, активация Tх1-иммунного ответа ($P < 0,05$). У 76,92±11,69% пациентов опытной группы выявлено увеличение пула антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови, что указывает на активацию специфического противотуберкулезного иммунного ответа.

Заключение. Разработанный способ и подходы могут быть более широко использованы в лечении пациентов с мультирезистентным туберкулезом легких в противотуберкулезных организациях страны областного и республиканского значения.

Ключевые слова: мультирезистентный туберкулез легких, дендритные клетки, микобактерии.

Туберкулез (ТБ) — хроническое инфекционное заболевание человека, вызываемое антропонозом — *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), — стало эндемичным приблизительно 10 тыс. лет назад [1, 2]. В настоящее время ТБ заболевает около трети населения планеты (более 2 млрд человек), ежегодно от него погибает более 3 млн человек [3]. ТБ легких инициируется

ингаляцией одной или нескольких микрочастиц, содержащих от 1 до 10 бактериальных клеток, которые, достигая альвеол, захватываются резидентными макрофагами (МФ). У лиц с высокой естественной противомикробной резистентностью микобактерии разрушаются активированными МФ, но часто уклоняются от воздействия факторов иммунной системы, тем самым снижая функциональную полноценность клеток системы мононуклеарных фагоцитов [4—6].

У иммунологически «наивных» лиц возбудитель ТБ экспоненциально растет и размножается в альвеолярных МФ в течение нескольких недель, устанавливая состояние инфекционного процесса. Механизмы внутриклеточной бактерицидности МФ, процессинг антигенов МБТ, образование комплексов «пептид + молекулы II класса HLA» и экспонирование их на мембране дендритных клеток (ДК) обуславливают распознавание и стимуляцию клонов Т-лимфоцитов (CD4+ типа Th1). Последние в ответ продуцируют цитокины, способствующие развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), образуя гранулему и ограничивая очаг инфекции от здоровой легочной ткани [7].

Таким образом, тесное взаимодействие ДК и CD4+ типа Th1 обеспечивает контроль репродукции возбудителя и механизмы противотуберкулезного иммунитета. Однако устанавливаемый при ТБ иммунитет не обладает стерилизующим эффектом, возбудитель не элиминируется и в течение жизни индивидуума сохраняется в латентной форме.

У лиц с повышенной восприимчивостью к инфекции (первичные и вторичные иммунодефициты, потребители наркотиков и алкоголя) взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками (АПК) и специфическими клонами Т-клеток нарушены. В результате клоны Т-лимфоцитов не в состоянии обнаружить антигены МБТ и развить Т-клеточный иммунный ответ достаточной для контроля инфекции силы. Более того, микроб, размножаясь в цитоплазме, вызывает продукцию воспалительных цитокинов, гибель фагоцитов и окружающих альвеолоцитов, миграцию содержащих бактерии фагоцитов в лимфоидную систему и, соответственно, диссеминацию возбудителя [7].

Дендритные клетки — группа иммуноцитов с уникальной функцией в иммунной системе. Их рассматривают в качестве профессиональных АПК, инициирующих и регулирующих развитие разных типов иммунного ответа, включая протективный иммунитет, иммуносупрессию и толерантность [8]. Предшественники ДК образуются в костном мозге и являются весьма пластичными. Под воздействием цитокинов и ростовых факторов направленно дифференцируются и мигрируют в разные ткани. Согласно данным литературы, в крови они обнаруживаются в виде прекурсоров 3 различных типов ДК: а) моноцитов крови (CD14+, CD11c+, CD1-); б) миелоидных ДК (CD14-, CD11c+, CD1c+ или CD14-, CD11c+, CD141+); в) лимфоидных ДК (CD14-, CD11c-, CD123+, CD303+) [8]. Незрелые

ДК тканей способны к фагоцитозу антигенов, но у них снижена функция антигенпрезентации. Зрелые ДК тканей (кожа, тимус, селезенка, лимфатические узлы, печень, кровь) экспрессируют молекулы CCR7, Human Leukocyte Antigen (HLA) II класса, CD80, CD86 и CD40, отвечают на воздействие хемокинов, эффективны в процессах презентации антигенов «наивным» CD4+ Т-клеткам и костимуляции [9].

Установлено, что моноциты больных ТБ легких характеризуются нарушением дифференцировки в моноцитарные ДК (мДК), а также существенно более слабым ответом на стимуляцию стандартным индуктором созревания α -ФНО по сравнению с ДК доноров. Дефект ДК может рассматриваться в качестве возможной причины повышенной чувствительности и неблагоприятного течения ТБ. В настоящее время инфицирование человека МБТ со множественной лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам (МЛУ ТБ) представляет существенную проблему, поскольку на фоне нарушений в иммунном статусе пациентов она не действенна и может сопровождаться рядом побочных эффектов, что требует поиска новых методов терапии.

Цель настоящего исследования — разработать метод адъювантной иммунотерапии пациентов с МЛУ ТБ на основе зрелых аутологичных мДК, праймированных антигенами МБТ, оценить его безопасность, иммунофизиологическую и клиническую эффективность.

Материал и методы

Диагноз МЛУ ТБ основывался на результатах клинического обследования и теста лекарственной чувствительности выделенного от пациента штамма МБТ, данных инструментальных лабораторных исследований. До получения результатов определения лекарственной чувствительности МБТ лечение пациентов проводили с использованием стандартной схемы. В дальнейшем назначали индивидуальную терапию с учетом результатов определения чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам. У каждого пациента брали письменное информированное согласие на участие в клинических испытаниях.

Контрольную группу составили 13 пациентов (11 мужчин и 2 женщины в возрасте 30—60 лет) с МЛУ ТБ, получавших лечение по схеме ВОЗ. Впервые выявленный МЛУ ТБ легких обнаружен у 4 (30,8%) человек, рецидив заболевания — у 5 (38,5%), хроническое течение ТБ — у 4 (30,8%) пациентов. Инfiltrативный ТБ отмечен у 11 (84,6%) больных, ФКТ — у 2 (15,4%). Контрольные показатели иммунного статуса у здоровых людей получены с использованием образцов венозной крови от 16 добровольцев — 10 мужчин и 6 женщин в возрасте 23—39 лет.

Группа пациентов для иммунотерапии включала 13 человек: 12 мужчин и 1 женщину, возраст — 23—52 года. Среди них впервые выявленный МЛУ ТБ легких отмечен у 3 человек, рецидив заболевания — у 6, диагноз «Неудача в лечении» — у 1 и хроническое течение ТБ — у 3 пациентов. В структуре клинических форм преобладал инfiltrативный ТБ легких в фазе

распада и обсеменения — у 11 человек, у 2 больных диагностирован ФКТ. Кислотоустойчивые МБТ были обнаружены методом бактериоскопии у 7 (53,8%) пациентов. У 6 (46,2%) человек МБТ выявлены только культуральными методами. Следует отметить, что из 13 обследованных к моменту начала иммунотерапии 3 (23,1%) больных были абацелированы.

Иммунотерапию пациентам с ТБ проводили с ноября 2009 г. по сентябрь 2010 г. на основании решения Комиссии по способам профилактики, диагностики, лечения и реабилитации Минздрава Республики Беларусь (протокол от 17.09.2009, письмо № 09-15/836-547 от 22.09.2009) на базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии. Протокол иммунотерапии пациентов с ТБ одобрен Комитетом по этике РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии (протокол заседания № 2 от 28.09.2009).

Бактериологические методы. Бактериологическое исследование диагностического материала от больных (мокрота) проводили на плотных питательных средах Левенштейна—Йенсена и Финна-II. Микроскопическое исследование выделенных культур МБТ по Цилю—Нильсену осуществляли в соответствии с «Инструкцией по выявлению туберкулеза бактериоскопическим методом» (Приложение 3 к приказу Минздрава Республики Беларусь № 106 от 04.07.2002). Чувствительность МБТ к противотуберкулезным препаратам определяли с использованием унифицированного метода абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна—Йенсена, регламентированного инструкцией по применению «Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза» от 30.12.2002.

Контроль культуры ДК на бактериальные и микотические загрязнения осуществляли путем двукратного посева суспензии незрелых ДК на среду Сабуро и тиогликолевую среду.

Для получения лизата культуры «аутологичных» штаммов МБТ тщательно отмывали в фосфатном буферном растворе от остатков питательной среды, суспендировали в фосфатном буферном растворе и подвергали многократным циклам замораживания—оттаивания в жидком азоте до просветления взвеси клеток. Осаждали содержимое пробирки и фильтровали супернатант через фильтры 0,2 мкм [10]. Осуществляли контроль стерильности лизата и определяли концентрацию белка. Количество лизата, необходимое для праймирования ДК, подбирали ранее в серии экспериментов *in vitro*.

Иммунологические методы. Исследовали следующие показатели:

1) общее число лейкоцитов, лейкоцитарную формулу;

2) иммунофенотип лимфоцитов в периферической крови (CD3, CD19, CD4, CD8, CD25, CD69, HLA-DR, CD28, CD16, CD56, T-cell Receptor (TCR)- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$, CD95);

3) внутриклеточные цитокины лимфоцитов в периферической крови: α -ФНО, γ -ИНФ, ИЛ-4 и ИЛ-17 после 6-часовой стимуляции форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и иономицином;

4) внутриклеточный γ -ИНФ мононуклеаров в периферической крови (МПК) после 6-часовой стимуляции лизатом аутологических МБТ и пролиферативный ответ МПК после 72-часовой инкубации с лизатом аутологических МБТ.

Иммунофенотип лимфоцитов и ДК исследовали с использованием моноклональных антител производства «Becton-Dickinson», «Sigma-Aldrich», «Invitrogen Corporation» и «Beckman Coulter» (США). Динамику пула антигенспецифических лимфоцитов в процессе иммунотерапии оценивали следующим образом: цельную кровь пациентов инкубировали с лизатом аутологических МБТ в концентрации 10 мкг/мл и монензином на протяжении 6 ч. Относительное число ИНФ- γ^+ -лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител на цитофлюориметре. Для оценки пролиферации лимфоцитов в ответ на антигены микобактерий цельную кровь пациентов инкубировали с лизатом аутологических МБТ в концентрации 10 мкг/мл на протяжении 30 ч, после чего добавляли бромодезоксиуридин (БРДУ), монензин и культивировали 6 ч. Исследуемые клетки фиксировали в растворе параформальдегида, затем пермеабелизировали в растворе сапонина или Triton X-100. Для выявления БРДУ клетки дополнительно инкубировали с раствором ДНК-азы, после чего инкубировали с моноклональными антителами и проводили учет результатов на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («Becton Dickinson», США) при помощи программного обеспечения «CellQuest», версия 3.6, и «Weasel», версия 2.7.4 («WENI», Австралия) [11].

Подготовка культур ДК, предназначенных для иммунотерапии. Разработанная схема подготовки культур аутологических мДК, предназначенных для терапии больных с МЛУ ТБ, представлена на рис. 1.

Культуры мДК готовили из моноцитов периферической крови каждого пациента индивидуально. МПК выделяли из 40—50 мл венозной крови пациента на градиенте фиколл-пака с плотностью 1077 г/л («Amersham», США) [12]. Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии и культивировали в бессывороточной питательной среде AIM-V («Invitrogen», США), содержащей рекомбинантные человеческие цитокины: 100 нг/мл ГМ-КСФ и 25 нг/мл ИЛ-4 («StemCell Technologies», Канада) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 7 сут [13]. Затем ДК отмывали от питательной среды в фосфатном буферном растворе и культивировали на протяжении 6 ч в питательной среде с 10 мкг/мл лизата «аутологических» МБТ. После праймирования ДК отмывали от лизата и культивировали в среде, содержащей 25 нг/мл ГМ-КСФ и 12,5 нг/мл ИЛ-4, α -ФНО (50 нг/мл) и дибутирил-цАМФ (10⁻⁶М) в качестве индуктора созревания в течение суток [14—15].

Культуры ДК проходили тщательный контроль, включающий несколько этапов: 1) подсчет числа ДК в суспензии и оценка их жизнеспособности; 2) оценка морфологии ДК; 3) оценка иммунофенотипа ДК; 4) контроль микробиологической чистоты. Перед введением пациенту культуры ДК отмывали однократно в DPBS, затем дважды в большом объеме официального раствора натрия хлорида, суспендировали

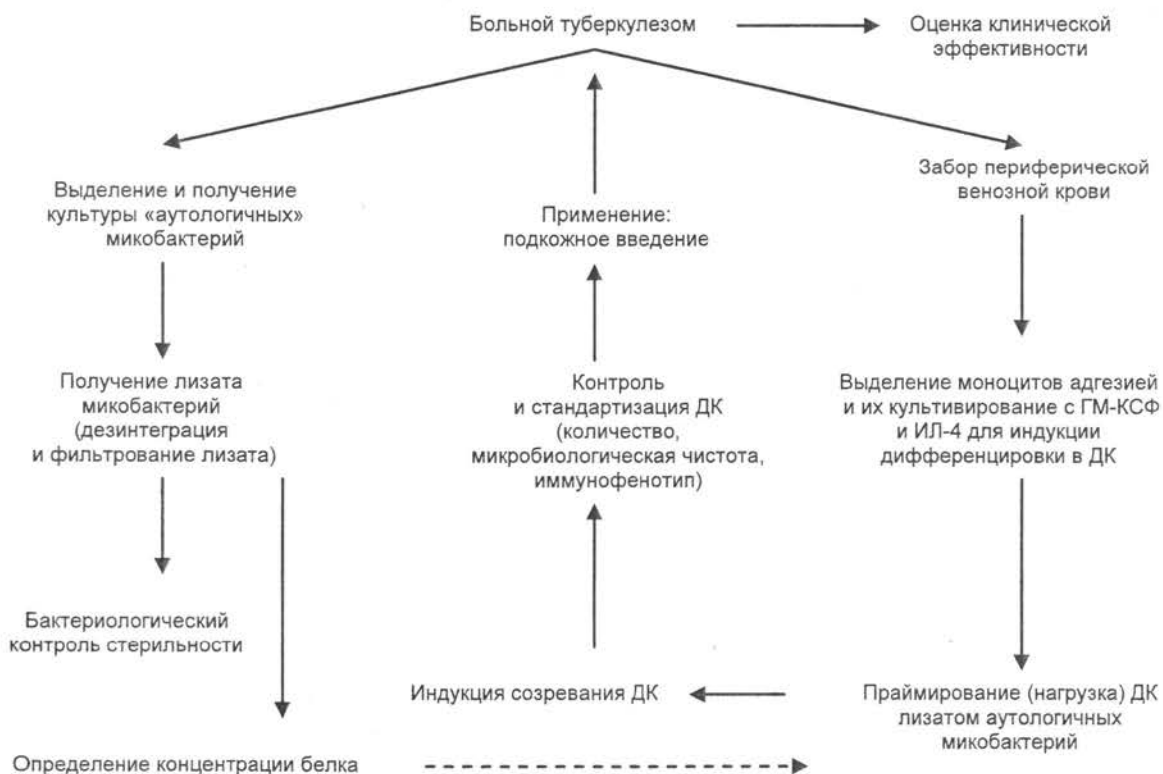


Рис. 1. Схема подготовки культур мДК для иммунотерапии пациентов с туберкулезом

в 1—2 мл физиологического раствора, помещали суспензию клеток в стерильные пробирки и доставляли в течение 1—2 ч в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии. ДК вводили подкожно в предплечье с соблюдением правил асептики и антисептики.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ STATISTICA 8—9 («StatSoft», США) и StatPlus 4.9 («AnalystSoft», США) [16, 17]. Значения показателей представлены в виде Ме [25—75], где Ме — медиана, 25 и 75 — интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро—Уилка. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна—Уитни, для сравнения связанных выборок — критерий Вилкоксона. Статистическую значимость различий между качественными характеристиками оценивали при помощи критерия χ^2 . Для определения зависимостей между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика культур ДК, предназначенных для аутоиммунотерапии пациентов с МЛУ ТБ. Среднее количество мДК, введенных пациентам в 3 этапа, составило 15,8 [12,0—18,7]·10⁶. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения красителя — трипанового синего, составляла во всех случаях более 99%. Морфологию ДК исследовали визуально при помощи инвертированного микроскопа с использованием метода фазового контрастирования при увеличениях 100, 200 и 400. ДК во всех исследованных пробах на 7-е сутки культивирования были морфологически однородны, характеризовались звездчатыми клеточными формами с наличием типичных для ДК цитоплазматических отростков.

С целью контроля иммунофенотипа мДК, полученных от больных с МЛУ ТБ, исследовали экспрессию молекул CD11c, CD83, CD86. В целом ДК характеризовались значительной плотностью экспрессии всех исследованных молекул, что подтверждается высокими показателями интенсивности их флуоресценции и возможностью четкого разделения «позитивных» и «негативных» популяций клеток (рис. 2). Видно, что 99,3 [98,5—99,6]% анализированных клеток культуры ДК пациентов несут молекулу CD11c, экспрессия CD86 составила 99,3 [98,8—99,7]%, CD83 — 94,8 [90,9—97,7]%. Учитывая, что для выделения предшественников ДК — моноцитов — использовали метод адгезии, не удалось избежать присутствия лимфоцитов. Во всех культурах ДК примесь лимфоцитов составляла не более 25%.

Во всех исследованных культурах отсутствовали признаки микробной контаминации. После заверше-

ния контроля и стандартизации на каждую культуру ДК оформляли аналитический паспорт, который включал данные о пациенте (фамилия, имя, отчество, год рождения), дату забора крови и ее объем, дату, время приготовления и характеристику культуры ДК (внешний вид, объем суспензии, количество ДК, их жизнеспособность, иммунофенотип, стерильность), условия транспортировки, хранения и итоговое заключение о возможности использования.

Динамика клинико-лабораторных показателей у пациентов с МЛУ ТБ. Для полного анализа результатов лечения в соответствии с критериями ВОЗ необходимо значительно большее время наблюдения, нежели длительность проведенных клинических испытаний, поскольку лечение может быть признано завершенным как минимум через 18 мес после конверсии мокроты. В настоящей работе проведена оценка результатов терапии пациентов опытной и контрольной групп через 2—2,5 мес после иммунотерапии.

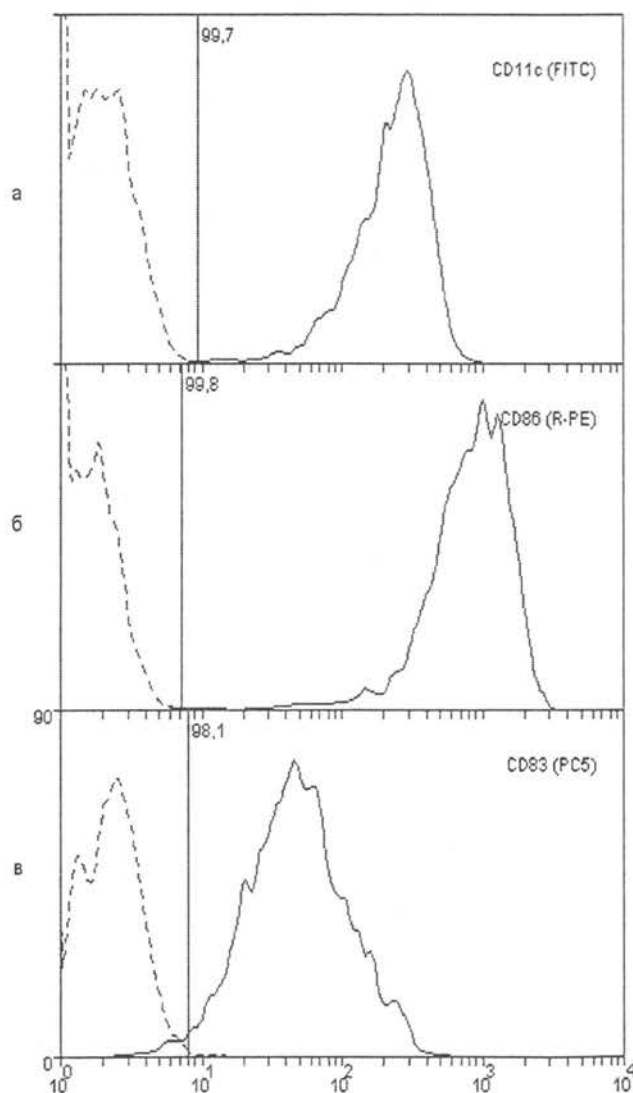


Рис. 2. Иммунофенотипическая характеристика ДК: а — гистограмма флуоресценции по каналам FL1 (FITC); б — по каналам FL2 (R-PE); в — по каналам FL3 (PC5). Пунктирной линией обозначен контрольный образец, непрерывной — клетки, инкубированные с антителами

Критериями эффективности терапии служили следующие показатели: снижение интенсивности бактериовыделения, позитивная рентгенологическая динамика воспалительного процесса (уменьшение зоны инфильтрации, уменьшение или закрытие полостей) с момента начала последнего курса сочетанной иммунотерапии ДК и химиотерапии. Эффективность проводимой терапии контролировали по динамике микробиологических, лабораторных и показателей функции иммунной системы больных с МЛУ ТБ, а также данных рентгенологических методов исследования до введения мДК и через 2—2,5 мес.

В период проведения иммунотерапии из опытной группы исключили 3 человека. Два пациента были выписаны из стационара вследствие нарушения больничного режима. Одного больного выписали с улучшением, но он отказался явиться на контрольное обследование в связи с проживанием в Гродненской области.

В процессе проведения курса иммунотерапии локальные реакции в месте введения аутологичных мДК отмечались у 4 человек: гиперемия до 15 мм — у 2, подкожные инфильтраты до 20 мм — у 2 больных. У всех пациентов, у которых регистрировали кожные реакции на вводимые ДК, выявлено увеличение пула клеток ИНФ- γ^+ , отвечающих на стимуляцию лизатом МБТ. Кожные реакции ГЗТ максимально проявлялись к 3-м суткам, то есть через 48—72 ч, в дальнейшем их интенсивность уменьшалась и в течение 1 мес они полностью исчезали без остаточных изменений на коже и в подкожной клетчатке. У остальных пациентов отмечалась только реакция от уко-

ла (<2 мм) в месте введения. Ухудшение состояния пациентов в процессе лечения клинически не наблюдалось. Отрицательной динамикой биохимических показателей, общего анализа крови и мочи в ранние сроки после введения культур мДК также не выявлено. Таким образом, мониторинг состояния пациентов позволяет сделать вывод об удовлетворительной переносимости и безопасности иммунотерапии больных ТБ аутологичными моноцитарными ДК.

Полученные данные свидетельствуют, что в 69,22±12,8% наблюдений (9 больных), где применялась комплексная химиотерапия и мДК, отмечалась положительная рентгенологическая динамика, а в 30,76±12,8% случаев (4 пациента) ее не было. Снижение интенсивности бактериовыделения в этой группе наблюдалось у 9 (69,22±12,8%) из 13 обследованных.

В контрольной группе в 69,22±12,8% наблюдений не отмечалась рентгенологическая динамика, у 30,76±12,8% она была положительной. Снижение интенсивности бактериовыделения в данной группе наблюдалось у 4 (30,76±12,8%) из 13 пациентов.

С целью оценки эффективности проводимой терапии контролировали показатели иммунного статуса у больных с МЛУ ТБ до введения мДК и через 2—2,5 мес после (табл. 1).

Достоверных различий в соотношении Т-лимфоцитов и их субпопуляций, В-лимфоцитов, естественных киллеров и лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD25, CD69, HLA-DR, CD28, TCR- $\alpha\beta$ и TCR- $\gamma\delta$, между группами пациентов с МЛУ ТБ до проведения терапии не выявлено ($P>0,05$). В то же время абсолютное число клеток CD3+, CD8+, HLA-DR+,

Таблица 1

Иммунофенотип лимфоцитов в периферической крови у пациентов с МЛУ ТБ

| Показатель | Добровольцы | Опытная группа | | Контрольная группа | |
|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|
| | | до лечения | после лечения | в начале испытаний | через 2—2,5 мес после начала испытаний |
| CD3+, % | 72,71 [66,76—78,63] | 75,48 [68,81—78,6] | 76,39 [66,31—78,16] | 73,45 [70,49—76,09] | 73,2 [72,7—79,68] |
| абс. | 1,72 [1,43—2,03] | 1,86 [1,60—2,20] | 1,34 [1,00—1,64]* | 1,32 [0,93—1,46]*** | 1,47 [1,14—1,80] |
| CD19+, % | 10,39 [8,49—13,27] | 10,04 [8,31—12,45] | 11,75 [6,64—12,22] | 6,64 [4,92—10,91]*** | 6,57 [5,11—10,06]*** |
| абс. | 0,27 [0,19—0,32] | 0,26 [0,23—0,35] | 0,21 [0,13—0,25] | 0,12 [0,07—0,13]*** | 0,15 [0,10—0,23]*** |
| CD4+, % | 46,25 [42,49—53,80] | 39,61 [33,11—41,96]*** | 45,72 [36,14—50,12] | 44,03 [40,34—50,45] | 45,68 [39,09—47,96] |
| абс. | 1,12 [0,87—1,23] | 0,98 [0,90—1,26] | 0,78 [0,55—0,91]*** | 0,89 [0,51—0,94]*** | 0,88 [0,70—1,17] |
| CD8+, % | 27,60 [23,59—31,93] | 34,62 [30,27—38,22]*** | 30,63 [28,47—33,32]*** | 32,38 [28,3—36,16]*** | 30,74 [25,98—36,88] |
| абс. | 0,62 [0,49—0,80] | 0,89 [0,70—1,05]*** | 0,59 [0,38—0,74]* | 0,59 [0,41—0,64] | 0,63 [0,47—0,73] |
| CD4+/CD8+, % | 1,85 [1,56—1,97] | 1,07 [1,01—1,34]*** | 1,47 [1,22—1,67]*** | 1,40 [1,19—1,57]*** | 1,50 [1,24—1,92] |
| CD3-CD16+CD56+, % | 13,73 [9,23—16,13] | 11,56 [7,18—21,12] | 12,86 [8,63—16,28] | 14,41 [12,31—15,51] | 14,43 [9,04—16,23] |
| абс. | 0,32 [0,20—0,37] | 0,29 [0,19—0,39] | 0,18 [0,15—0,45] | 0,23 [0,19—0,28] | 0,30 [0,15—0,42] |
| CD4+CD25+, % | 3,13 [2,25—4,56] | 6,53 [5,28—7,10]*** | 8,00 [7,46—9,28]**** | 6,2 [4,51—8,74]*** | 6,32 [5,14—7,25]*** |
| абс. | 0,07 [0,05—0,13] | 0,16 [0,13—0,22]*** | 0,14 [0,12—0,17]*** | 0,10 [0,08—0,13] | 0,13 [0,08—0,19]*** |
| HLA-DR+, % | 15,50 [13,36—18,85] | 20,55 [17,22—28,04]*** | 21,06 [18,30—27,56]*** | 15,16 [10,1—18,33] | 17,36 [13,76—30,13]** |
| абс. | 0,35 [0,30—0,49] | 0,68 [0,39—0,82] | 0,51 [0,32—0,61] | 0,24 [0,18—0,32] | 0,40 [0,31—0,54]** |
| CD3+HLA-DR+, % | 5,41 [3,82—6,99] | 8,02 [5,09—13,68] | 6,61 [4,96—9,73] | 3,09 [1,99—11,11] | 6,27 [3,29—10,72] |
| абс. | 0,15 [0,08—0,20] | 0,22 [0,14—0,39] | 0,13 [0,08—0,28] | 0,06 [0,04—0,12]*** | 0,14 [0,08—0,18]** |
| CD69+, % | 6,67 [4,68—8,29] | 5,69 [3,26—8,62] | 6,33 [3,83—8,51] | 7,5 [6,0—12,48] | 6,35 [4,50—10,51] |
| абс. | 0,14 [0,09—0,18] | 0,13 [0,10—0,21] | 0,13 [0,09—0,16] | 0,13 [0,10—0,17] | 0,16 [0,09—0,21] |
| TCR $\alpha\beta$ +, % | 65,10 [58,45—70,54] | 63,01 [54,6—69,89] | 66,57 [54,40—72,34] | 65,53 [62,7—69,09] | 61,58 [57,27—66,72] |
| абс. | 1,53 [1,17—1,90] | 1,64 [1,46—1,85] | 1,12 [0,90—1,39]*** | 1,19 [0,78—1,31]*** | 1,35 [0,91—1,70] |
| TCR $\gamma\delta$ +, % | 5,69 [4,70—7,11] | 2,53 [1,84—5,43] | 1,97 [1,53—4,89]*** | 2,94 [1,69—3,58]*** | 2,76 [1,50—3,42]*** |
| абс. | 0,14 [0,09—0,18] | 0,09 [0,04—0,14] | 0,05 [0,02—0,08]*** | 0,04 [0,03—0,08]*** | 0,05 [0,03—0,10]*** |
| CD28+, % | 59,51 [53,97—61,44] | 45,7 [42,66—55,11]*** | 47,05 [43,16—57,02]*** | 52,19 [36,95—58,81]*** | 43,70 [39,5—56,1]*** |
| абс. | 1,31 [1,13—1,59] | 1,24 [1,01—1,63] | 0,97 [0,66—1,10]*** | 0,97 [0,51—1,23]*** | 0,93 [0,70—1,25]*** |

*Здесь и в табл. 2 достоверные различия показателей до и после терапии в опытной группе ($P<0,05$);

**достоверные различия показателей до и после терапии в контрольной группе ($P<0,05$);

***достоверные различия показателей в сравнении с таковыми в группе добровольцев ($P<0,05$).

CD3+HLA-DR+, TCR- $\alpha\beta$ + и CD28+ достоверно различалось между группами до проведения иммунотерапии. Данный факт объясняется достоверным увеличением абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов у пациентов опытной группы по сравнению с показателями в контрольной (лейкоциты: опытная группа — $7,8 [6,6-8,2] \cdot 10^6/\text{мл}$, контрольная — $5,5 [3,9-6,5] \cdot 10^6/\text{мл}$, $P=0,03$; лимфоциты: $35,0 [30,0-42,0]\%$ и $28,0 [24,0-35,0]\%$ соответственно, $P=0,03$).

В процессе иммунотерапии с применением мДК выявлен ряд изменений в иммунном статусе и иммунофенотипе лимфоцитов в периферической крови: достоверное уменьшение абсолютного числа клеток CD3+, CD4+ и CD8+ вследствие уменьшения показателя лимфоцитов в крови (до лечения — $35 [30-42]\%$, после — $29 [24-32]\%$, $P=0,041$). Соотношение CD4/CD8 Т-лимфоцитов после иммунотерапии существенно возросло с $1,07 [1,01-1,34]$ до $1,47 [1,22-1,67]$ ($P<0,05$), хотя все еще оставалось ниже, чем в группе практически здоровых добровольцев. Отмеченная динамика показателя CD4/CD8 указывает на положительные сдвиги в иммунном статусе и развитии адекватного иммунного ответа, что можно рассматривать в качестве благоприятного прогностического признака. Иммунологические сдвиги ассоциируются также с увеличением в крови относительного числа CD4+CD25+ регуляторных Т-лимфоцитов после иммунотерапии (до лечения — $6,53 [5,28-7,10]\%$, после — $8,00 [7,46-9,28]\%$ ($P<0,05$), что согласуется с вышеприведенными наблюдениями.

В табл. 2 представлены данные о пуле лимфоцитов, продуцирующих цитокины α -ФНО, γ -ИНФ, ИЛ-4, ИЛ-17 в периферической крови у больных с МЛУ ТБ и у лиц контрольной группы.

Между обследуемыми группами больных с МЛУ ТБ различий в продукции внутриклеточных цитокинов до проведения клинических испытаний не выявлено, что свидетельствует о сравнимой функциональной активности лимфоцитов.

Установлено, что достоверно большее относительное число лимфоцитов у больных с МЛУ ТБ в обеих группах как до, так и после лечения продуцировали γ -ИНФ по сравнению с контролем ($P<0,05$). У пациентов контрольной группы выявлено достоверное снижение пула ИНФ- γ^+ -лимфоцитов в периферической крови ($P<0,05$). У лиц с ТБ после курса иммунотерапии количество ИНФ- γ^+ -клеток достоверно не отличалось от показателей до терапии (хотя и имело некоторую тенденцию к снижению), что, по-видимому, является благоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим об отсутствии иммуносупрессии Т-клеток.

В опытной группе до проведения иммунотерапии экспрессия ИЛ-17 была сравнима с таковой в группе здоровых добровольцев. После проведения лечения ДК отмечалось увеличение пула ИЛ-17+ лимфоцитов по сравнению с группой добровольцев ($P<0,05$). Однако не выявлено различий между исследованным показателем до и после терапии. В контрольной группе после стандартного лечения происходило уменьшение фракции ИЛ-17-продуцирующих клеток по сравнению с группой добровольцев ($P<0,05$). После терапии у пациентов опытной группы достоверно снизилось количество клеток, продуцирующих ИЛ-4, что в совокупности с данными, свидетельствующими об отсутствии существенной динамики изначально повышенного числа ИНФ- γ^+ -клеток, может указывать на активацию CD4+ Th1-зависимого иммунного ответа ($P<0,05$).

Таким образом, иммунотерапия пациентов с МЛУ ТБ аутологичными ДК в сочетании со стандартной схемой химиотерапии способствовала восстановлению позитивных иммунофизиологических процессов в иммунной системе — нормализации индекса CD4/CD8, увеличению в периферической крови пула активированных/регуляторных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов, активации CD4+ Th1-обусловленного иммунного ответа ($P<0,05$).

ТБ легких может развиваться в результате следующих процессов: а) прогрессии первичной инфекции вследствие ингаляционного заражения высоковирулентным и множественно-резистентным возбудителем; б) эндогенной реактивации латентно протекающей инфекции на фоне снижения/нарушения функции ДК и Т-лимфоцитов; в) экзогенной реинфекции новым резистентным к противотуберкулезным препаратам штаммом микобактерии аэрогенным путем; г) формирования иммуносупрессии. Традиционные подходы к терапии больных ТБ, инфицированных множественно-резистентными микобактериями, не дают должного результата. В связи с этим в последнее время ДК вызывают повышенный интерес исследователей благодаря относительной легкости их получения *ex vivo* и способности эффективно представлять антиген Т-лимфоцитам, то есть в конечном итоге обеспечивать развитие протективного иммунного ответа. Значительный опыт в этом отношении накоплен по иммунотерапии больных со злокачественными новообразованиями с использованием праймированных антигеном мДК. Установлен достоверный клинический эффект иммунотерапии ДК у больных раком различных локализаций [18—20]. Клинические испытания разработанного авторами

Таблица 2

Относительное содержание лимфоцитов, продуцирующих цитокины α -ФНО, γ -ИНФ, ИЛ-4, ИЛ-17 у пациентов с МЛУ ТБ

| Показатель | Добровольцы | Опытная группа | | Контрольная группа | |
|------------------|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|
| | | до лечения | после лечения | в начале испытаний | через 2—2,5 мес после начала испытаний |
| γ -ИНФ, % | 7,11 [5,12—13,95] | 22,81 [14,39—27,82]*** | 15,65 [12,05—24,06]*** | 25,28 [18,02—32,42]*** | 13,95 [11,36—18,56]**** |
| ИЛ-17, % | 0,13 [0,07—0,20] | 0,38 [0,10—0,83] | 0,47 [0,24—0,72]*** | 0,85 [0,32—1,26]*** | 0,20 [0,00—0,79] |
| α -ФНО, % | 24,30 [18,18—31,50] | 11,82 [10,28—16,13]*** | 8,43 [4,12—16,37]*** | 7,78 [3,39—17,81]*** | 6,65 [3,66—12,29]*** |
| ИЛ-4, % | 0,53 [0,33—1,08] | 0,50 [0,10—0,67] | 0,06 [0,00—0,15]**** | 0,19 [0,02—0,64] | 0,07 [0,00—0,13]**** |

данной статьи способа терапии вирусного гепатита В с использованием ДК показали безопасность и эффективность его применения, способность восстанавливать и нормализовать иммунофизиологические процессы [21]. Полученные результаты индуцируют поиск новых и совершенствование существующих технологий получения ДК, их созревания, праймирования и активации, а также более эффективных способов введения, показывают возможность более широкого использования клеточной иммунотерапии ДК в клинической практике. Патентно-информационный поиск не выявил работ, в которых использовался бы метод клеточной терапии МЛУ ТБ праймированными ДК, что свидетельствует о высоком уровне научной новизны.

Как показали исследования разных авторов, для оценки динамики формирования специфического иммунного ответа на терапию ДК возможно применение следующих методов: кожные тесты с антигеном, использованным для праймирования ДК; прямое определение антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови при помощи тетрамерных антител; определение цитокинпродуцирующих клеток после сокультивирования с антигеном и последующей детекцией внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии или при помощи метода ELISPOT; выявление цитотоксического эффекта CD8 Т-лимфоцитов на клетки-мишени, экспрессирующие антиген; определение пролиферативного ответа лимфоцитов на антиген до и после терапии; исследование экспрессии генов цитокинов [18, 22]. Предпочтительным методом является выявление Т-лимфоцитов, отвечающих за продукцию цитокинов CD4+ Th1-спектра в ответ на стимуляцию антигенами [18].

В результате 3-месячного курса иммунотерапии праймированными зрелыми аутологичными ДК у 76,92±11,69% пациентов увеличился пул лимфоцитов, продуцирующих γ -ИНФ в ответ на стимуляцию *in vitro* лизатом аутоштамма МБТ (до терапии — 1,57 [0,9—2,81], после — 3,15 [2,3—3,64], $P=0,006$). Полученные данные демонстрируют накопление в крови и тканях фракции антигенспецифических ИНФ- γ^+ Т-лимфоцитов у пациентов с МЛУ ТБ, подтверждая тем самым наличие стимулирующего и регуляторного влияния праймированных ДК на противотуберкулезный иммунный ответ [23]. Вместе с тем общий пул пролиферирующих клеток (Т- и В-лимфоцитов) в ответ на стимуляцию лизатом МБТ существенно не отличался у пациентов с МЛУ ТБ до и после проведенной иммунотерапии. Общий показатель пролиферации с учетом по включению БРДУ не коррелировал с количеством ИНФ- γ^+ -клеток до ($R=0,187$, $P=0,541$) и после ($R=0,217$, $P=0,476$) лечения, что можно рассматривать как низкую чувствительность данного теста, а также что ДК в первую очередь стимулируют ранее сенсибилизированные антигенспецифические клоны Т-клеток, относительное содержание которых по отношению к пулу пролиферирующих Т- и В-лимфоцитов не велико. У всех больных с положительной динамикой специфического иммунного ответа (увеличение числа ИНФ- γ^+ -клеток мини-

мум в 1,5 раза) также наблюдался клинически значимый ответ на терапию ДК (по данным рентгенографии и интенсивности бактериовыделения). Из 3 пациентов, у которых не выявлено увеличение числа ИНФ- γ^+ -лимфоцитов, у 1-го не было положительной динамики клинико-лабораторных показателей, у 2-го наблюдалось существенное улучшение, у 3-го — частичное улучшение (абацилирование при стабильной рентгенологической картине туберкулезного процесса в легких).

Таким образом, известно, что химиотерапия, используемая для лечения туберкулеза, имеет множество недочетов, обусловленных недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов, таких как гепато- и нейротоксичность, диспепсические расстройства, аллергические реакции. Большинство химиопрепаратов угнетают иммунитет, что в совокупности с иммунодепрессией, обусловленной микобактериями, нарушает функцию иммунной системы, хотя именно антигенспецифический иммунный ответ по значимости играет первостепенную роль в противостоянии инфекции и выздоровлении. Иммунотерапия с использованием ДК восстанавливает физиологический потенциал иммунной системы, обеспечивает ее контроль над репродукцией возбудителя путем воздействия на процессы инициации и динамику накопления антигенспецифических CD4+ Th1-лимфоцитов.

Наблюдение за состоянием пациентов показало удовлетворительную переносимость и безопасность предложенного способа иммунотерапии. Установлено, что сочетание стандартной схемы химиотерапии множественно-лекарственно-устойчивого туберкулеза с применением ДК способствовало снижению массивности бактериовыделения (69,23±12,8% наблюдений против 30,76±12,8% в группе сравнения, $P<0,05$), положительной рентгенологической динамике (69,23±12,8% наблюдений в опытной группе и 30,76±12,8% — в контрольной, $P<0,05$). У пациентов опытной группы после терапии ДК установлена тенденция к нормализации индекса CD4/CD8, выявлено увеличение числа активированных/регуляторных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов, показана активация Th1-иммунного ответа ($P<0,05$). У 76,92±11,69% больных опытной группы отмечено увеличение пула антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови, что указывает на активацию специфического противотуберкулезного иммунного ответа.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований по отработке и оптимизации всех этапов подготовки ДК для персонализированной адъювантной иммунотерапии, по подбору и стандартизации иммуногенных пептидов, доставке антигенов ДК, доставке ДК в региональную иммунную систему, а также обеспечению и регуляции ответа клонов Т-лимфоцитов, равно как и методов клинической и лабораторной оценки результатов. Разработанный способ и подходы могут использоваться в лечении пациентов с МЛУ ТБ в противотуберкулезных организациях страны областного и республиканского значения [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Mckinney J. D., Jacobs W. R., Bloom B. R. // *Emerging Infections*.— London, 1998.— P. 51—146.
2. WHO annual report on global TB control — summary // *Wkly Epidemiol. Rec.*— 2003.— Vol. 78.— P. 122—128.
3. Скрыгина Е. М. и др. // Проблемы фтизиатрической службы на современном этапе: Материалы 7 съезда фтизиатров Республики Беларусь и науч.-практ. конф. «Диагностика и лечение туберкулеза в свете международной стратегии DOTS».— Минск, 2008.— С. 69—90.
4. Титов Л. П. Вопросы иммунологии: Республиканский ежегодник. сб. науч. работ.— Минск, 1979.— С. 55—59.
5. Титов Л. П. // Проблемы туберкулеза.— 1978.— № 6.— С. 64—69.
6. Титов Л. П., Батян А. Н. Актуальные вопросы фтизиатрии и пульмонологии: Сб. науч. работ НИИ пульмонологии и фтизиатрии.— Минск, 1990.— С. 82—89.
7. Титов Л. П. Иммунология. Терминологический словарь.— М., 2008.
8. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., et al. // *Blood*.— 2010.— Vol. 116.— P. 74—80.
9. Schuurhuis D. H., Fu N., Ossendorp F., et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.*— 2006.— Vol. 140.— P. 53—72.
10. Bai G., McCue L. A., McDonough K. A. // *J. Bacteriol.*— 2005.— Vol. 187, № 22.— P. 7795—7804.
11. Методы проточной цитометрии в медицинских и биологических исследованиях / Под ред. М. П. Потапнева.— Минск, 2003.
12. Stanilova S. A., Dobrova Z. G., Slavov E. S. // *Trakia J. Sci.*— 2005.— Vol. 3, № 1.— P. 43—48.
13. Гончаров А. Е., Титов Л. П. // Докл. НАН Беларуси.— 2008.— Т. 52, № 1.— С. 92—96.
14. DuBuske L. M., Hancharou A. Y., Titov L. P. // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 2008.— Vol. 121, № 2 (Suppl.).— P. S11.
15. Гончаров А. Е., Титов Л. П. // Изв. НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук.— 2008.— № 3.— С. 5—10.
16. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.— М., 2008.
17. Genser B., Cooper P. J., Yazdanbakhsh M., et al. // *BMC Immunol.*— 2007.— Vol. 27 № 8—P.
18. Curigliano G., Spitaleri G., Pietri E., et al. // *Ann. Oncol.*— 2006.— Vol. 17.— P. 750—762.
19. Lau R., Wang F., Jefferery G., et al. // *J. Immunother.*— 2001.— Vol. 24, № 1.— P. 66—78.
20. Engell-Noerregaard L., Hansen T. H., Andersen M. H., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.*— 2009.— Vol. 58.— P. 1—14.
21. Titov L. P., Hancharou A. Y., Zhmuroskaya L. S., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 2010.— Vol. 125, № 2 (Suppl.).— P. AB13.
22. Khanna K. M., Blair D. A., Vella A. T., et al. // *J. Immunol.*— 2010.— Vol. 85.— P. 239—252.
23. Титов Л. П. // Медицина.— 1998.— № 1.— С. 29—33.
24. Титов Л. П., Гончаров А. Е., Скрыгина Е. М. и др. Метод иммунотерапии пациентов с мультирезистентным туберкулезом аутологичными моноцитарными дендритными клетками: Инструкция по применению.— Минск, 2010.

Поступила 12.05.11.