

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Дигто Зульфия Каримкуловна

**ФАКТОРЫ ДИСФУНКЦИИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК  
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

профессор О.И. Уразова

доктор медицинских наук

О.В. Воронкова

ТОМСК-2013

## Оглавление

Список сокращений	5
Введение	7
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Современный взгляд на происхождение дендритных клеток	13
1.2. Факторы активации и функции дендритных клеток	16
1.3. Рецепторный аппарат дендритных клеток	23
1.4. Участие дендритных клеток в формировании иммунологической толерантности	29
1.5. Роль дендритных клеток в распознавании микобактерий туберкулеза	31
1.6. Нарушение процессов активации дендритных клеток при туберкулезе легких	34
Глава 2. Материал и методы исследований	39
2.1. Объект исследования	39
2.2. Материал исследования	41
2.3. Методы исследования	41
2.3.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови	41
2.3.2. Выделение моноцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов путем градиентного центрифугирования	42
2.3.3. Трансформация моноцитов в дендритные клетки	42
2.3.4. Определение поверхностных маркеров CD80, CD86, CD-209, HLA-DR и TLR2 на дендритных клетках с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии	44
2.3.5. Оценка секреторной активности дендритных клеток	46
2.3.5.1. Измерение концентрации IL-18 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток	46
2.3.5.2. Измерение концентрации IL-12 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток	47

2.3.6. Приготовление ядерных лизатов дендритных клеток для определения содержания внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB	48
2.3.7. Определение содержания внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в ядерных лизатах дендритных клеток	48
2.4. Статистический анализ результатов исследования	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких	51
3.1.1. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	51
3.1.2. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)	53
3.1.3. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
3.2. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких	56
3.2.1. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	56
3.2.2. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)	57
3.2.3. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	59

3.3. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких	61
3.3.1. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	61
3.3.2. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)	62
3.3.3. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом в зависимости от спектра лекарственной устойчивости <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	63
3.4. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких	64
3.4.1. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	64
3.4.2. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)	64
3.4.3. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в лизатах дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом в зависимости от спектра лекарственной устойчивости <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	67
Выводы	91
Список литературы	93

## Список принятых сокращений

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ВИН – вторичная иммунологическая недостаточность

ДК – дендритная клетка

ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких

ИС – иммунологический синапс

ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких

КЛ – клетки Лангерганса

ЛАМ – липоарабиноманнан

ЛПС – липополисахарид

ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких

ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких

МЛУ ТЛ – множественно лекарственно-устойчивый туберкулез легких

ПАМС – патоген-ассоциированные молекулярные структуры

ТЛ – туберкулез легких

ТМБ – тетраметилбензидин

CCL (*chemokine ligand*) – хемокиновые лиганды

CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4

DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin receptor*) – специфичный ICAM-3-захватывающий неинтегриновый рецептор дендритных клеток

GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор

HLA (*human leukocyte antigen*) – человеческий лейкоцитарный антиген

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) – молекула клеточной адгезии-1

ИКВ – ингибиторная кВ-киназа

IL – интерлейкин

IRF (*interferon regulation factor*) – интерферон-регулирующий фактор

JAKs (Janus kinase) – киназы семейства Janus

JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) – c-Jun NH<sub>2</sub>-терминальная киназа

M-CSF (*monocyte colony-stimulating factor*) – моноцитарный колониестимулирующий фактор

MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) – миелоидный фактор дифференцировки 88

NF-κB (*nuclear factor κB*) – ядерный фактор транскрипции κB

PDL (*programming death ligand*) – лиганд, программирующий гибель клетки

PRR (*pattern-recognition receptor*) – паттерн-распознающий рецептор

SIP (*stock isotonic percoll*) – изотонический раствор перколла

SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) – супрессоры цитокинового сигнала

STAT (*signal transducers and activators of transcription protein*) – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции

TAK1 (*TGF-β activated kinase 1*) – TGF-β-активирующая киназа 1

TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) – TIR-домен-содержащий адаптерный белок

TLR (*Toll-like receptor*) – Toll-подобный рецептор

Treg – регуляторный Т-лимфоцит

TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-including interferon-β*) – TIR-домен-содержащий адаптерный белок, включающий интерферон-β

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – фактор роста эндотелия сосудов

## Введение

**Актуальность темы исследования.** За последнее десятилетие заболеваемость туберкулезом легких (ТЛ) приобрела широкие масштабы в связи с изменением свойств микобактерий туберкулеза, в частности, расширением спектра их резистентности к лекарственным препаратам основного ряда и высокой вирулентностью инфицирующих штаммов [Уразова О.И., 2010; Хасанова Р.Р. и соавт., 2011]. Наряду с этим, заболеваемость туберкулезом, распространенность и тяжесть патологического процесса при туберкулезе во многом определяются степенью поражения иммунной системы [Новицкий В.В. и соавт., 2011; Есимова И.Е. и соавт., 2012].

Исследования последних лет показали, что развитие вторичной иммунологической недостаточности (ВИН) у больных ТЛ сопряжено с повреждающим влиянием возбудителя *Mycobacterium tuberculosis* на иммунокомпетентные клетки крови [Уразова О.И. и соавт., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Сахно Л.В. и соавт., 2012; Churina E.G. et al., 2012]. В основе нарушений специфического иммунитета при ТЛ лежат Т-клеточный дефицит, снижение пролиферативной активности лимфоцитов и активация их апоптоза, цитокиновый дисбаланс и активация иммуносупрессорных механизмов, связанных с гиперфункцией регуляторных Т-клеток, что приводит к дисрегуляции как клеточно-опосредованного, так и гуморального звеньев иммунитета [Хасанова Р.Р. и соавт., 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2010; Comas I. et al., 2011; Сахно Л.В. и соавт., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013].

Рассматривая иммунный ответ в целом как комплекс последовательных клеточных взаимодействий с участием антигенпрезентирующих клеток (макрофаги, дендритные клетки), Т-лимфоцитов-хелперов, клеток-эффекторов и секретируемых ими иммунорегуляторных биомолекул, следует отметить, что нарушения его возможны уже на стадии связывания и презентации антигена дендритной клеткой (ДК) и последующего образования иммунного синапса между ДК и Т-лимфоцитом [Ерохин В.В., 2009; Ярилин А.А., 2010; Сахно Л.В. и

соавт., 2012; Шепелькова Г.С. и соавт., 2012]. Это является обязательным условием активации Т-клеток, их дифференцировки и пролиферации с формированием клона антигенспецифических лимфоцитов. Образование зрелого иммунного синапса происходит только при условии полноценного созревания ДК, экспрессии ими всех необходимых рецепторов, в число которых входят молекулы главного комплекса гистосовместимости и костимуляторные молекулы семейства В7 (CD80 и CD86) [Merad M. et al., 2009; Ярилин А.А., 2010; Geissmann F. et al., 2010; Есимова И.Е. и соавт., 2012; Song Q. et al., 2013; Suchard S.J. et al., 2013]. В противном случае активации Т-клетки не происходит. Наряду с этим известно, что многие инфекционные возбудители, в том числе *Mycobacterium tuberculosis*, способны вызывать дисфункцию рецепторного аппарата как антигенпрезентирующих клеток, так и Т-лимфоцитов и, как следствие, нарушение не только индуктивной, но и продуктивной (эффektorной) фазы иммунного ответа [Лепнина О.Ю. и соавт., 2009; Valboa L. et al., 2010; Новицкий В.В. и соавт., 2012; Person A.K. et al., 2012].

**Степень разработанности.** В аспекте изучения особенностей иммунопатогенеза различных клинико-патогенетических вариантов туберкулеза легких основное внимание уделяется оценке Т-клеточного звена иммунитета, но практически неисследованными остаются молекулярные механизмы дисрегуляции противотуберкулезного иммунного ответа на уровне антигенпрезентирующих клеток и их взаимодействий с Т-лимфоцитами в связи с биологическими свойствами инфицирующего штамма возбудителя и клинической формой туберкулезной инфекции.

**Цель исследования:** определить патогенетические факторы нарушений функциональной активности дендритных клеток у больных с различными клинико-патогенетическими вариантами туберкулеза легких.

**Задачи исследования:**

1. Оценить способность моноцитов крови трансформироваться в дендритные клетки *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких.

2. Проанализировать состояние рецепторного аппарата, цитокин-секреторную активность дендритных клеток и содержание в них ядерного фактора транскрипции NF-κB у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.
3. Определить патогенетические факторы нарушений функциональной активности дендритных клеток в зависимости от клинико-патогенетического варианта туберкулеза легких и спектра резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии.

**Научная новизна.** Впервые дана комплексная оценка нарушений рецептор-экспрессирующей и цитокин-секреторной функции ДК у больных ТЛ в зависимости от клинической формы заболевания, чувствительности возбудителя к препаратам этиотропной терапии и спектра его лекарственной резистентности. Показано, что у больных ТЛ число трансформированных *in vitro* из моноцитов крови ДК с фенотипом CD209<sup>+</sup> выше, чем у здоровых доноров вне зависимости от клинико-патогенетического варианта инфекции. Обнаружено, что дисфункция ДК при ТЛ проявляется снижением количества TLR2<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> и CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (иммуногенных) клеток, что опосредует нарушение индуктивной стадии противотуберкулезного иммунитета. Наряду с этим, содержание в ДК активной формы транскрипционного фактора NF-κB, регулирующего экспрессию клетками молекул костимуляции и секрецию цитокинов, соответствует норме. Одновременно с этим установлено, что вне зависимости от клинической формы и варианта ТЛ количество ДК, экспрессирующих молекулы костимуляции CD80 и HLA-DR (за исключением монорезистентного ТЛ), увеличивается. При этом продукция IL-12 и IL-18 ДК *in vitro* у больных ТЛ варьирует в зависимости от формы ТЛ и лекарственной чувствительности возбудителя. Понижение секреции IL-12 отмечается при инфильтративном ТЛ, а IL-18 – при монорезистентном и множественно лекарственно-устойчивом ТЛ. В то же время для диссеминированного и лекарственно-чувствительного ТЛ характерным является

увеличение секреции ДК обоих цитокинов. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии *M. tuberculosis* на показатели функциональной активности ДК. При этом проявления рецептор-экспрессирующей (TLR2, HLA-DR, CD86) гипофункции ДК наиболее выражены при ТЛ с лекарственной монорезистентностью возбудителя.

**Практическое и теоретическое значение работы.** Полученные результаты могут послужить основой для разработки патогенетически обоснованных подходов к направленной коррекции нарушений противотуберкулезного иммунного ответа на этапе его инициации (запуска) посредством активирующего воздействия на функции ДК по связыванию антигена, формированию иммунного синапса и индукции Т-клеток. Использование полученных данных возможно в иммунодиагностике ВИН у больных ТЛ при уточнении стадии нарушений противотуберкулезного иммунного ответа, а также при разработке вакцин нового поколения против туберкулезной инфекции на основе активированных ДК.

Результаты работы применяются в учебном процессе на кафедрах патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России для студентов лечебного, педиатрического и медико-биологического факультетов

**Методология и методы исследования.** Согласно поставленным задачам выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современных научно-исследовательских лабораторий ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. В качестве материала исследования использовали моноциты крови, трансформированные в ДК. Основные методы исследования:

1. Выделение, культивирование и трансформация *in vitro* моноцитов периферической крови в ДК с использованием стимуляторов их созревания;
2. Иммунофенотипирование ДК методом проточной цитометрии с определением поверхностных молекул CD209 (маркер миелоидных ДК), TLR2 (рецептор для связывания антигена), HLA-DR (молекулы главного комплекса гистосовместимости для презентации антигена), CD80 и CD86 (молекулы костимуляции);

3. Определение содержания внутриклеточного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в ядерных лизатах в ДК (иммуноферментный анализ);
4. Оценка цитокин-секреторной (IL-12, IL-18) активности ДК (иммуноферментный анализ);
5. Статистический анализ результатов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Высокая трансформационная активность моноцитов крови в CD209<sup>+</sup> дендритные клетки *in vitro* у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких с чувствительностью и устойчивостью возбудителя к препаратам этиотропной терапии сочетается с признаками дисфункции дендритных клеток.

2. Патогенетическими факторами дисфункции дендритных клеток у больных туберкулезом легких являются: дефицит рецепторов для связывания антигена (TLR2) и костимуляции (CD86) на фоне гиперэкспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, снижение числа иммуногенных CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> клеток и вариабельность секреции IL-12 и IL-18 *in vitro* в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания.

3. Характер нарушений функциональной активности дендритных клеток, трансформированных *in vitro* из моноцитов крови, зависит от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* с наибольшей выраженностью рецептор-экспрессирующей гиподисфункции клеток в сочетании с дефицитом секреции IL-18 при монорезистентном туберкулезе легких.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-экспериментального материала, использованием современных методов (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты, полученные в результате выполнения диссертационной работы, докладывались и обсуждались на Всероссийской научной конференции молодых

ученых «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (г. Санкт-Петербург, 2011), Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2012) и II Всероссийской конференции молодых ученых «Сибирские медицинские чтения» (г. Барнаул, 2012).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2046), РФФИ (Проект №11-04-98057-р\_сибирь\_a), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (16.120.11.614-НШ) и на средства персонального гранта компании Carl Zeiss в рамках программы поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых вузов России (договор от №8/11 КЦ от 10 апреля 2012 г.).

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 6 полнотекстовых статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 5 рисунками и 12 таблицами. Библиографический указатель включает 228 источников, из которых 90 отечественных и 138 зарубежных авторов.

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях лично автором.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современный взгляд на происхождение дендритных клеток

Среди многообразия антигенпрезентирующих клеток (АПК) иммунной системы особое место занимают дендритные клетки (ДК). Уникальность ДК заключается в их способности активировать (в 10-100 раз) наивные Т-клетки, т.е. индуцировать первичный адаптивный иммунный ответ, что значительно отличает их от других АПК (макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты) [Пащенко М.В., Пинегин Б.В., 2006; Szabo A. et al., 2013]. ДК участвуют не только в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа против микробных и опухолевых антигенов, но и презентации антигена праймированным Т-клеткам памяти в паракортикальных зонах вторичных лимфоидных органов и В-лимфоцитам [Steinman R.M., 2006]. Помимо иммунного ответа ДК участвуют в Т-клеточном гомеостазе, а именно, в процессе поддержания численности и клонального состава наивных Т-лимфоцитов, тем самым определяя процесс негативной селекции аутореактивных клонов Т-клеток в тимусе [Ярилин А.А., 2005; Palucka K. et al., 2013]. Популяция ДК представлена «классическими» клетками миелоидного и лимфоидного происхождения, плазмоцитоидными клетками и клетками Лангерганса (КЛ). Такое разнообразие субпопуляций и широкое распространение в организме позволяет им взаимодействовать практически со всеми группами клеток иммунной системы [Хоченков Д.А., 2008; Gabrielle T.V., Stephen L.N., 2012]. ДК обнаруживаются практически во всех тканях организма, однако наиболее многочисленны они в коже и слизистых оболочках. Деление на субпопуляции осуществляется с учетом особенностей морфологии и поверхностного антигенного состава [Ueno H. et al., 2007]. Миелоидные и лимфоидные ДК характеризуются фенотипом CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>low</sup> и CD11c<sup>-</sup>, CD123<sup>high</sup> соответственно. Лимфоидные ДК экспрессируют на поверхности низкий уровень CD4, CD45RA, с-тип лектиновых рецепторов CD303 и CD304,

высокий уровень рецепторов к IL-3 (CD123) и способны секретировать большое количество интерферона (IFN) типа 1. КЛ экспрессируют ряд поверхностных маркеров, отсутствующих на других подтипах ДК, в частности лангерин (CD207), E-кадгерин. Молекула CD207 присутствует только на КЛ и является специфическим маркером этих клеток. Отличительным морфологическим признаком КЛ являются цитоплазматические полимембранные органеллы, называемые гранулами Бирбека, однако на сегодняшний момент функция гранул неизвестна [Пальцев М.А. и соавт., 2009; Kang L., Nussenzweig M.C., 2010].

Все популяции ДК формируются из общей клетки-предшественницы костномозгового происхождения. Ряд авторов утверждают, что ДК могут образовываться как из клеток миелоидного, так и лимфоидного ряда [Manz M.G. et al., 2001]. Моноциты, полученные из периферической крови человека и мыши, обработанные гранулоцитарно-моноцитарным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и интерлейкином (IL) 4 трансформируются *in vitro* в ДК, что указывает на миелоидное их происхождение [Gabrielle T.B., Stephen L.N., 2012; Steinman R.M., 2012].

CD8, CD2, CD25 и BP-1 являются типичными лимфоидными маркерами и экспрессируются на мембране ДК, выделенных из тимуса и селезенки мышей, тем самым определяют лимфоидное их происхождение. Лимфоидные клетки-предшественницы с фенотипом  $CD4^{lo}c-kit^{+}Sca-1^{+}Sca-2^{+} (CD4^{low})$  формируют  $CD8^{+}$  ДК, Т-, В-лимфоциты, но развитие из них  $CD8^{-}$  ДК и клеток миелоидного ряда ограничено [Wu L. et al., 2001; Merad M., Manz G.M., 2009].

Клетки-предшественницы как лимфоидного, так и миелоидного происхождения имеют высокий уровень экспрессии рецепторов к цитокину Flt3 [D'Amico A., Wu L., 2003; Watowich S.S., Liu Y.J., 2010]. Flt3 наиболее эффективный цитокин, способный влиять на формирование, распределение и гомеостаз ДК [Liu K., Nussenzweig M.C., 2010]. Было показано, что введение мышам ингибитора тирозинкиназы Flt3 приводит к значительному снижению образования ДК, особенно лимфоидного происхождения, тогда как формирование КЛ не изменяется. Сигнальная трансдукция от Flt3-рецептора проходит при

участии транскрипционного фактора STAT3. Делеция гена *STAT3* супрессирует развитие ДК, а гиперэкспрессия его даже в Flt3-негативных клетках-предшественницах восстанавливает дифференцировочный потенциал [Merad M., Manz G.M., 2009].

Развитие ДК требует присутствия в микроокружении не только ростового цитокина Flt3, но и других факторов роста. GM-CSF играет главную роль в дифференцировке мышиных и человеческих гемопоэтических миелоидных предшественников в ДК. На это указывает тот факт, что после введения мышам аденовируса, экспрессирующего GM-CSF или GM-CSF с длительным периодом полураспада, из клеток-предшественниц образуются CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ДК, продуцирующие провоспалительные цитокины, в том числе фактор некроза опухолей (TNF)  $\alpha$  и IL-6, оксид азота. GM-CSF является ключевым цитокином для формирования миелоидных ДК и может участвовать в дифференцировке ДК при патологическом процессе, но его наличие не требуется для генерации ДК из CD4<sup>low</sup> лимфоидных предшественников. Сигнальная трансдукция, опосредованная GM-CSF, происходит через активацию транскрипционных факторов STAT3, STAT5, IRF4 (*interferon regulation factor 4*) и супрессию транскрипционного фактора IRF8 (*interferon regulation factor 8*) [Merad M., Manz G.M., 2009]. IL-4 также способствует созреванию ДК, увеличивая их антигенпрезентирующие свойства. В настоящее время IL-4 используют в основном для культивирования ДК при получении противоопухолевых вакцин [Steinman R.M., 2012].

Дифференцировка ДК требует участия молекул семейства STAT (*signal transducers and activators of transcription protein*). Белок STAT5 необходим на всех этапах клеточного созревания ДК, в то время как молекулы STAT1 и STAT6 используются только на определенных этапах дифференцировки. Так, активация транскрипционного фактора STAT1 ингибирует экспрессию молекул CD86 на поверхности плазматоидных и миелоидных ДК, а экспрессия CD40 супрессируется только на мембране плазматоидных ДК. У предшественников ДК молекула STAT6 находится в неактивном состоянии. Зрелые миелоидные ДК постоянно экспрессируют белок STAT6, а снижение уровня его экспрессии

коррелирует с увеличением концентрации молекул SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) – SOCS1, SOCS2, SOCS3 [Manz M.G. et al., 2001].

Схему дифференцировки ДК условно можно разделить на 4 стадии: 1) пролиферирующие предшественники в красном костном мозге (про-ДК); 2) пролиферирующие и непролиферирующие предшественники в крови (пре-ДК); 3) незрелые антигенпоглощающие ДК в нелимфоидных и лимфоидных тканях; 4) зрелые антигенпрезентирующие ДК в клеточных зонах вторичных лимфоидных органов [Пащенко М.В., Пинегин Б.В., 2006; Geismann F. et al., 2010].

## 1.2. Факторы активации и функции дендритных клеток

Процесс созревания и активации ДК осуществляется только в условиях инфекции, разрушения тканей и воспаления. Незрелые ДК локализуются в местах антигенной инвазии, наибольшее количество их отмечается в дерме, слизистых, в лимфатических узлах и маргинальных зонах белой пульпы селезенки [Воробьев А.А., Быков А.С., 2006; Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., 2008]. Незрелые ДК характеризуются активным захватом антигенов из окружающей среды, однако они не могут активировать Т-клетки, что связано с низким уровнем процессинга, невысокой поверхностной экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости (HLA) и молекул костимуляции. Опсонизированные и неопсонизированные корпускулярные антигены поглощаются ДК с помощью фагоцитоза. Захват опсонизированных растворимых молекул осуществляется с помощью рецептор-опосредованного механизма и макропиноцитоза. Незрелые ДК и их предшественники – моноциты, имеют высокую адгезию к стеклу или пластику и являются CD14-позитивными клетками, в отличие от зрелых ДК. Общее количество подосом, необходимых для миграции в очаг воспаления, больше на незрелых ДК, чем на поверхности зрелых ДК [West M.A. et al., 2008]. Ферментативный состав вакуолей в процессе созревания также претерпевает изменения. Так, в незрелых ДК присутствуют только неспецифические эстеразы, такие ферменты как миелопероксидаза и лизоцим, характерные для фагоцитов, в

них отсутствуют [Мейл Д. и соавт., 2007]. Увеличение количества лизосомальных компартментов и мембранных протеинов, ассоциированных с лизосомами, формирование цитоплазматических отростков на клетках – это те морфологические изменения, которые претерпевает ДК при созревании. Незрелые ДК характеризуются высокой экспрессией молекул CCR1, CCR5, CCR6, низким содержанием на поверхности молекул CCR7, CD40, CD54, CD80, CD86 и CD58 [Banchereau J. et al., 2000; Ziegler-Heltbrock L. et al., 2010].

Привлечение незрелых ДК и их предшественников в очаги воспаления, откуда они после созревания направляются в Т-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов, происходит за счет экспрессии высокого уровня рецепторов к воспалительным хемокинам; последние вырабатываются при инфекции и тканевом повреждении в нелимфоидных органах. Основные представители этой группы – CCL (*Chemokine ligand*) 2, 3, 4, 5, 7, 8 и 13, а также CXCL 8 (*CXC chemokines ligand 8*) (IL-8), CXCL 9, 10, 11. Созревание ДК сопровождается быстрым уменьшением плотности поверхностных рецепторов к воспалительным хемокинам, а затем и снижением синтеза их мРНК. Одновременно увеличивается количество поверхностных рецепторов CCR7 к лимфоидным хемокинам CCL19 и CCL21. В результате данных изменений зрелые ДК более не удерживаются в зоне воспаления и под действием градиента концентрации CCL21 мигрируют в просвет лимфатических сосудов, а затем в регионарные лимфатические узлы и в интерфолликулярные отростки Т-клеточных зон, где и осуществляется задержка ДК. Секреция CCL19 осуществляется не только клетками эндотелия, ретикулярными клетками стромы лимфатического узла, но и самими ДК. Возможно, что это необходимо для обмена антигенной информации с вновь прибывшими ДК, и для привлечения наивных Т-лимфоцитов (Th0) [Woolf E. et al., 2007; Forster R. et al., 2008]. Во вторичных лимфоидных органах завершаются процессы созревания ДК и индуктивная фаза иммунного ответа, в ходе которой процессированный антиген представляется Th0-лимфоцитам. При созревании ДК увеличивается экспрессия HLA, CD80, CD86, CD54, CD58, CD40, CCR7, т.е. повышается антигенпрезентирующая и

костимулирующая активность клеток. Экспрессия данных поверхностных молекул необходима для последующей активации эффекторных клеток [Пальцев М.А. и соавт., 2009; Vanchereau J. et al., 2000; Gabrielle T.B., Stephen L.N., 2012].

Ключевым моментом в запуске иммунного ответа является образование иммунного синапса (ИС) между ДК и лимфоцитом, что обусловлено наличием соответствующих поверхностных молекул на обеих клетках. В результате образования ИС осуществляется обмен информацией между иммунокомпетентными клетками, а также контролируются такие процессы, как активация, дифференцировка и пролиферация лимфоцитов. Формирование ИС необходимо для передачи двух основных сигналов, первый из которых – информация об антигене; производится за счет распознавания TCR-рецептором Т-лимфоцитов комплекса антигена и молекул HLA (Рисунок 1).

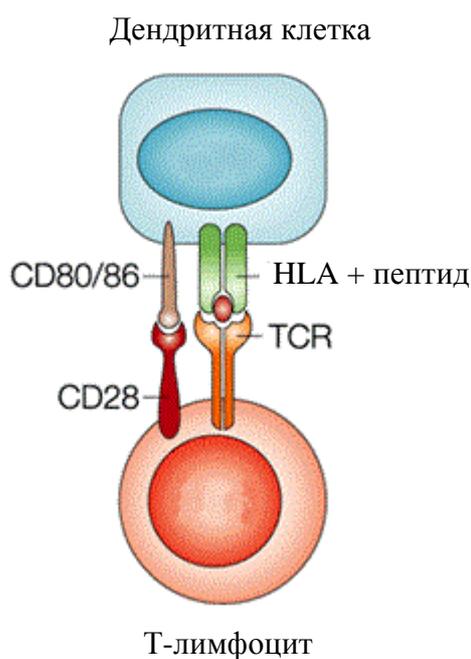


Рисунок 1. Формирование иммунного синапса между дендритной клеткой и Т-лимфоцитом (по данным А.А. Ярилина, 2010).

При контакте TCR с комплексом «пептид – HLA» больше порогового времени наивная Т-клетка активируется и претерпевает клональную пролиферацию и дифференцировку в эффекторные клетки. Данный процесс

длится в течение 4-5 дней и сопровождается качественным изменением набора поверхностных молекул адгезии, которые направляют уже эффекторные Т-клетки из лимфоидных тканей в места локализации патогена [Ивашкин В.Т., 2008; Sallusto F., Lanzavecchia A., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2013].

Второй и немаловажный внутриклеточный сигнал осуществляется за счет костимуляторных молекул со стороны ДК, которые необходимы для полноценной активации Т-лимфоцитов, их дифференцировки и секреции цитокинов. Этот сигнал поступает в результате взаимодействия костимулирующих молекул семейства В7, в частности В7.1 (CD80) и В7.2 (CD86) на поверхности ДК с рецептором CD28 на поверхности Т-лимфоцита. Известно, что молекула CD28 конститутивно располагается на поверхности всех покоящихся CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Многие ученые считают, что именно через данное взаимодействие обеспечивается секреция IL-2 и IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами [Ивашкин В.Т., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Хоченков Д.А., 2010]. Связывание CD80 более важно для индукции цитотоксического ответа, отторжения трансплантата и противоопухолевой защиты, тогда как CD86-зависимый сигнал необходим для развития первичного гуморального иммунного ответа и индукции пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов. Сигнал с молекулы CD40 способствует увеличению числа отростков на поверхности ДК, усиливает экспрессию молекул HLA и корецепторов CD80/CD86, а также увеличивает секрецию цитокинов и дифференцировку Т-лимфоцитов в Th2-клетки, что обуславливает развитие гуморального иммунного ответа [Grewal I.S., Fravell R.A., 1996; Liu K., Nussenzweig M.C., 2010].

Адгезины также играют важную роль при первоначальном контакте между ДК и Т-лимфоцитами. Решающее значение в таких первичных контактах имеет взаимодействие между молекулами CD54 на мембране ДК и CD11a/CD18 на поверхности Т-лимфоцита, а также взаимодействие молекул, относящихся к CD2, локализованных на поверхности Т-клеток, и CD58 на поверхности ДК [Grakoui A. et al., 1999; Palucka K. et al., 2013].

Кроме того, зрелые ДК способны секретировать провоспалительные цитокины, в частности цитокины семейства IL-12 [Guermontprez P. et al., 2002; Middel P. et al., 2010]. В данное семейство включают следующие цитокины – IL-12, IL-23, IL-27. Несмотря на то, что все они участвуют в поддержании врожденного и приобретенного иммунитета и имеют высокую структурную гомологию, механизм активации Т-лимфоцита и его дифференцировки в Th1-клетки различен [Brombacher F. et al., 2003; McKenzie B.S. et al., 2006]. Важно отметить, что большинство клеток организма продуцируют только неактивную субъединицу IL-12p35, которая лишь в комплексе с молекулой p40 обладает биологической активностью. При этом целая молекула IL-12 секретируется только нейтрофилами, активированными макрофагами, зрелыми ДК, клетками Лангерганса. Наиболее важной функцией данного цитокина является поляризация дифференцировки Th0 клеток в Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (Th1) и последующая секреция ими IFN $\gamma$ . После дифференцировки Th1-клетки перестают нуждаться в IL-12 в качестве сигнала костимуляции [Фрейдлин И.С., 1999; Olleros M.L. et al., 2007; Aagaugue S. et al., 2008; Lippitz В.Е., 2013]. IL-12 блокирует развитие Т-лимфоцитов-хелперов типа 2 (Th2), что сопровождается снижением продукции IgE и IgA. Некоторые ученые считают, что секреция IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами осуществляется в результате действия IL-12 и активации молекулы STAT4 [Фрейдлин И.С., 1999; Lippitz В.Е., 2013]. Однако, согласно другим исследованиям, немаловажную роль в продукции IFN $\gamma$  Т-клетками играет молекула T-bet [Ярилин А.А., 2010]. IL-12, как мощный провоспалительный цитокин, способен индуцировать продукцию ряда других цитокинов, в частности IL-6, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$ , GM-CSF [Brown J. et al., 2011].

Активировать пролиферацию покоящихся Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (NK-клеток), циркулирующих в периферической крови, IL-12 не способен, но в сочетании с низкими дозами IL-2 он может поддерживать рост, распространение и выживание ранее активированных Т-клеток, в том числе CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных клонов [Хасанова Р.Р. и соавт., 2008]. Под влиянием IL-12 повышается активность цитотоксических Т-лимфоцитов, ускоряется процесс

созревания и усиливаются антигенпрезентирующие свойства ДК. Кроме того, он повышает иммунологическую память, способствует активации В-клеток, является связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом. Поскольку IL-12 способен повышать антигенпрезентирующую активность ДК, то данное свойство цитокина активно используется для создания противоопухолевых вакцин [Кетлинский С.А., 2005; Ganguly D. et al., 2013].

IL-27 структурно похож на молекулу IL-12, состоит из субъединиц IL-12p35 и EBV3 (*Epstein-Barr-virus induced gene 3*). Он активирует молекулы STAT1 и STAT3 через соответствующие рецепторные молекулы WSX-1 (*IL-27R, Interleukin-27 receptor alpha chain*) и gp130 на поверхности Т-лимфоцитов, тем самым стимулируя раннюю их пролиферацию. С помощью увеличения экспрессии молекул ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) и активации T-bet IL-27 приводит к ранней дифференцировке Т-клеток в направлении Th1 и супрессии Th2 и Т-лимфоцитов-хелперов типа 17 (Th17). Биологическая роль IL-27 заключается в увеличении экспрессии IL-12Rβ2 на поверхности наивных Т-лимфоцитов [Фрейдлин И.С., 1999; Ярилин А.А., 2010; Есимова И.Е. и соавт., 2012; Хасанова Р.Р. и соавт., 2013].

IL-23 способствует пролиферации преимущественно CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти и инициирует синтез последними цитокинов IL-22 и IL-17. IL-23 обладает адьювантными свойствами и вместе с IL-12 усиливает представление CD8α<sup>+</sup> ДК опухолевого толерогенного антигена. Активность IL-23 и IL-27 усиливается в отношении индукции цитотоксических клеток при поражении вирусом гепатита С [Кетлинский С.А., 2005; Xu M. et al., 2010].

Помимо секреции цитокинов семейства IL-12 зрелые ДК способны продуцировать IL-18. IL-18 вырабатывается в виде неактивного предшественника. Зрелый белок IL-18 представлен гликозилированным протеином с молекулярной массой 18,3 кДа. Цитокин относят к семейству IL-1, т.к. он обладает выраженной с ним гомологией. Рецептор к IL-18 структурно сходен с рецептором к IL-1 типа 1 и относится к суперсемейству иммуноглобулин-подобных рецепторов. Рецепторный комплекс IL-18 является гетеродимером и включает в себя две цепи

–  $\alpha$ -цепь и  $\beta$ -цепь. По отношению к иммунокомпетентным клеткам IL-18 обладает плеiotропным эффектом. Основная его функция – это индукция синтеза IFN $\gamma$  Т-лимфоцитами и NK-клетками. При этом для синтеза IFN $\gamma$  Т-клетками требуется синергичное влияние IL-12 и IL-18, однако биологические механизмы, лежащие в основе влияния цитокинов на секрецию IFN $\gamma$ , различны. Так, IL-12 влияет на продукцию IFN $\gamma$  через активацию Janus kinase (JAKs) JAK2 и Tyk2 и транскрипционных факторов STAT3 и STAT4, а IL-18 – через c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) и транскрипционный фактор p65/p50 NF- $\kappa$ B. Возможно, синергичное действие данных цитокинов объясняется перекрытием и усилением всех путей транскрипции при совместном их влиянии [Agaugue S. et al., 2008; Талаев В.Ю. и соавт., 2010].

Ряд авторов утверждают о взаимно реципрокной стимуляции рецепторов IL-12 и IL-18, т.е. IL-12 увеличивает экспрессию рецептора к IL-18, а IL-18 стимулирует экспрессию рецептора к IL-12. Это еще один из механизмов их синергичного действия [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Якушенко Е.В. и соавт., 2005; Ueno H., 2010; Brown J. et al., 2011].

Важно отметить, что IL-18 является ростовым и дифференцировочным фактором только для Th1-клеток. Предполагается, что рецептор к данному цитокину присутствует только на поверхности Th1-лимфоцитов [Якушенко Е.В. и соавт., 2005; Хрипко О.П. и соавт., 2008].

Таким образом, контакт со зрелыми ДК и представление последними антигена в комплексе с HLA способствует процессу пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, т.е. к запуску адаптивного иммунного ответа [Прокопович С.К., Винницкий В.Б., 2001; Guermonprez P. et al., 2002]. Презентация ДК антигена Т-лимфоцитам определяет дифференцировку Т-клеток по Th1-, Th2- и Th17-типу. Три типа Т-хелперов необходимы для борьбы соответственно с интрацеллюлярными, многоклеточными и одноклеточными экстрацеллюлярными паразитами. Инструктивный сигнал передается от ДК к Т-хелперам с помощью цитокинов и поверхностных молекул, экспрессируемых ДК

в момент взаимодействия с Т-хелпером [Lebre С.М. et al., 2005; Хоченков Д.А., 2010; Basu R. et al., 2013].

### 1.3. Рецепторный аппарат дендритных клеток

Наличие специфического и разнообразного рецепторного аппарата незрелых ДК позволяет распознавать различные патогены, которые чаще всего представлены молекулярными компонентами, которые присутствуют только у микроорганизмов и отсутствуют у позвоночных (от мыши до человека). В литературе данные компоненты микроорганизмов обозначают термином патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС) (*pathogen associated molecular patterns – PAMPs*) [Хаитов Р.М. и соавт., 2007; Пальцев М.А., Северин С.Е., 2009].

Для распознавания ПАМС клетки врожденного иммунитета используют паттерн-распознающие рецепторы (PRR). По функциональному принципу PRR делят на три группы. К первой относят рецепторы, ответственные за фаго- и эндоцитоз. К ним относят мембранные CLR (*C-type lectine receptors*), скавенджер-месенджеры, рецепторы комплемента, Fc-рецепторы. Вторая группа включает рецепторы, обеспечивающие активацию АПК, а также TLR (*Toll-like receptor*), NLR (*NOD-like receptor*), RLR (*Rig-like receptor*). Функция данных рецепторов заключается в индукции основных защитных реакций врожденного иммунитета: воспаление, продукция антимикробных пептидов, запуск пирогенной реакции и выработка IFN $\gamma$ . К третьей группе относят гуморальные PRR (опсоины и рецепторы, активирующие комплемент), а также белки острой фазы. Биологическая роль их состоит либо в опсонизации ПАМС-несущих корпускулярных мишеней, либо в доставке растворимых ПАМС к мембранным PRR, либо в активизации комплемента [Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Тухватулин А.И. и соавт., 2010; Талаев В.Ю. и соавт., 2012].

Роль ДК в противомикробном иммунном ответе в основном опосредуется через рецепторы типа TLR. TLR – это семейство из 13 рецепторов,

каждый из которых взаимодействует с определенными типами ПАМС [Чикилева И.О. и соавт., 2010]. Нарушение функций TLR вносит свой вклад в патогенез многих инфекционных и иммуноопосредованных заболеваний. Дефект функционирования TLR приводит к тяжелым последствиям, к примеру, люди с низкой экспрессией TLR4 в 5 раз чаще заболевают инфекциями бактериальной природы по сравнению с людьми, имеющими нормальный ее уровень. Напротив, чрезмерная активация данных рецепторов способствует развитию сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа [Ганковская О.А., Зверев В.В., 2010].

TLR неодинаково представлены на разных субпопуляциях ДК. Миелоидные ДК в наибольшей степени экспрессируют на клеточных мембранах TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, а в эндоплазме – TLR3 и TLR8. Плазмоцитоидные ДК экспрессируют в цитоплазме TLR7 и TLR9. Структура TLR включает внеклеточный и внутриклеточный домены. Внеклеточный домен богат лейцитином и участвует в распознавании лиганда. Данный домен TLR гомологичен внутриклеточному домену рецептора к IL-1 и поэтому обозначается как TLR/IL-1-рецептор (TIR). Внутриклеточный домен необходим для последующей передачи сигнала в клетку [Ганковская О.А., Зверев В.В., 2010].

Для распознавания различных ПАМС, таких как липополисахариды (ЛПС), пептидогликаны, липопроотеины и липотейхоевые кислоты, флагеллин, бактериальная и вирусная ДНК, вирусная двухцепочечная РНК, TLR способны образовывать гомо- и гетеродимеры, а также комплексы с другими рецепторами и молекулярными структурами клеточных мембран [Бондаренко В.М., Лиходеев В.Г., 2009]. TLR опосредуют активацию секреции цитокинов и созревание ДК, увеличивая экспрессию поверхностных молекул, играющих важную роль в адаптивном иммунном ответе и необходимых для презентации антигена (в частности CD86, HLA-II). Активация сразу нескольких TLRs на поверхности ДК приводит к одновременному увеличению продукции как провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-23, IL-6, TNF $\alpha$ ), так и противовоспалительного цитокина IL-10. Подобный синергизм обнаружен для TLR4 и TLR7 и не является

специфичным только для этой пары рецепторов, поскольку аналогичные эффекты были отмечены с различными комбинациями лигандов TLR [Ганковская О.А., Зверев В.В., 2010; Vacchelli E. et al., 2013].

В результате взаимодействия лиганда с TLR происходит димеризация рецептора, последующая передача сигнала осуществляется благодаря адаптерным белкам – MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-including IFN $\beta$* ) и TRAM (*(TRIF)-related adaptor molecule*). Адаптерные молекулы передают сигнал на различные серин-треониновые киназы. Последние активируют транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B и AP-1, которые индуцируют экспрессию генов-мишеней. Наиболее изучены на сегодняшний момент два основных сигнальных пути: MyD88-опосредованный и TRIF-опосредованный. В ходе MyD88-зависимой сигнальной трансдукции последовательно активируются такие серин-треониновые киназы, как IRAK4, IRAK1, формируя, тем самым, комплекс MyD88/IRAK4/IRAK1. Молекула IRAK1 диссоциирует и образует комплекс с молекулой TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor-6*). Благодаря этому последняя приобретает убиквитин-лигазную активность и катализирует активацию TAK1 (*TGF- $\beta$  activated kinase 1*) [Broj V.G., Chen Z.J., 2009]. TAK1 индуцирует следующие группы мишеней: ингибиторную  $\kappa$ B-киназу (IKB), ответственную за активацию NF- $\kappa$ B, каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАП-киназ), который заканчивается на киназах первого уровня – JNK, ERK и p38 и приводит к активации транскрипционных факторов группы AP-1. NF- $\kappa$ B транслоцируется в ядро и индуцирует экспрессию основных активационных генов ДК, в числе которых гены провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF $\alpha$ ) и хемокинов [Пашенко М.В., Пинегин Б.В., 2006; Авдеев М.Г. и соавт., 2007]. Помимо AP-1 МАП-киназы фосфорилируют большое количество других белковых мишеней и вызывают разнообразные эффекты в ДК. МАП-киназа (митоген-активируемая протеинкиназа) p38 играет ключевую роль в индукции IL-12 – основного активатора НК-клеток и Т-хелперов типа 1 (Th1), и регулирует экспрессию TNF $\alpha$  путем стабилизации его мРНК. МАП-киназы также участвуют

в процессах выживания и апоптоза клеток. Однако, несмотря на то, что сигналы с рецепторов TLR способны в наибольшей степени стимулировать процессы созревания ДК, способность ДК к миграции при этом подавляется. Данная супрессия связывается со значительным снижением экспрессии белков GRS18 (*G-protein regulator signaling*) и GRS1, что в свою очередь угнетает ответную реакцию клеток на действие хемокинов [Хаитов Р.М. и соавт., 2007; Ракофф-Наум С., Меджитов Р., 2008; Талаев В.Ю., 2012].

Другой путь передачи сигнала – через TRIF, приводит к активации киназы TBK1 и далее транскрипционного фактора IRF3. IRF3 инициирует экспрессию IFN $\gamma$ . По имеющимся сегодня данным, рецепторы TLR 1, 2, 5, 6, 7, 8 и 9 используют MyD88/TIRAP-опосредованный сигнальный путь, а TLR3 – TRIF-зависимую сигнальную трансдукцию. TLR4 использует оба пути для передачи сигнала, чем, вероятно, объясняется разнообразие влияния ЛПС на иммунную систему. Стимуляция TLR активирует механизмы, направленные на элиминацию болезнетворных микроорганизмов, трансформированных или поврежденных клеток. Однако длительная активация TLR формирует состояние хронического воспаления, на фоне которого развивается иммунодепрессия [Чикилева И.О., Караулов А.В., 2010; Vacchelli E. et al., 2013]. Таким образом, активация определенных TLR может модулировать тип Т-хелперного ответа. Основными индукторами Th1-ответа являются IL-12p70 и IFN $\gamma$ , для оптимальной продукции которых необходима сочетанная активация MyD88- и TRIF-зависимых сигнальных путей [Fritz J.H. et al., 2007; Vadillo E. et al., 2012].

На ранних этапах противoinфекционного иммунного ответа необходима временная отмена супрессивного действия Treg (регуляторных) клеток. Данная отмена осуществляется IL-6, который вырабатывается ДК в первые часы после активации TLR на их клеточной поверхности. Секреция IL-6 является MyD88-зависимой. IL-6 действует не на Treg, а на наивные Т-клетки, делая их нечувствительными к Treg [Steinman M.R., 2000; Уразова О.И. и соавт., 2010].

Наряду с этим, при повторной стимуляции аналогичным ПАМС или ЛПС ДК теряют способность вырабатывать провоспалительные цитокины

(толерантность). Данный процесс необходим для ограничения чрезмерной воспалительной реакции. В течение 48-72 часов чувствительность к ПАМС восстанавливается. Перекрестная толерантность (нечувствительность к одному ПАМС после первичной стимуляции другим ПАМС) образуется на уровне сигнальных путей. Так, к примеру, все ПАМС, активирующие MyD88-зависимый путь, вызывают толерантность друг к другу, но не влияют на чувствительность к ПАМС, действующих через TRIF-зависимый путь. Толерантность формируется лишь в отношении транскрипции провоспалительных генов цитокинов, однако со стороны противовоспалительных генов таких изменений не обнаружено [Foster S.L. et al., 2007; Wesa A.K., Storkus W.J., 2008].

Рецепторный арсенал ДК включает в себя семейство NOD-рецепторов. К наиболее значимым цитоплазматическим паттерн-распознающим рецепторам относят NOD1 и NOD2, участвующие в распознавании компонентов пептидогликана грамположительных и грамотрицательных бактерий. Основная функция данных рецепторов это сообщение о разрыве фагосомы и выхода патогена из нее [Boechme K.W., Compton T., 2004; Козлов И.Г., Тимакова М.А., 2009]. Связывание NOD-рецепторов с лигандами приводит к активации серин-треониновой киназы RICK, которая активирует киназу ИКВ. Сигнальные пути с рецепторов NOD1 и NOD2 имеют различия между собой. Известно, что NOD1 является активатором ДК, в свою очередь NOD2 способен проявлять разнонаправленное влияние. В экспериментах на мышах было показано, что сигнальная NOD2-трансдукция приводит к усилению продукции TNF $\alpha$  и IL-6, но подавляет продукцию IL-12. Возможно, роль NOD2 состоит в предотвращении гиперактивации ДК. После взаимодействия NOD-рецептора со своим лигандом происходит индукция серин-треониновой киназы RIP2, которая в дальнейшем определяет активацию транскрипционных факторов p38, NF- $\kappa$ B. Помимо генов цитокинов мишенями их служат гены молекул адгезии, острофазных белков, ферментов воспаления, молекул HLA [Sirard J.-C. et al., 2007; Broj V.G., Chen Z.J., 2009].

В общем, функция различных субпопуляций ДК заключается в процессинге антигенов и активации Т-лимфоцитов, но, несмотря на это, они различаются по экспрессии мембранных маркеров, типам миграции и цитокинопродукции. Данные отличия могут определять судьбу активированных клеток, баланс между иммунным Th1- и Th2-ответом [Талаев В.Ю. и соавт., 2010]. Для обозначения функциональных подгрупп ДК, индуцирующих соответствующий тип Т-хелперного ответа, были предложены термины «дендритная клетка 1» (ДК1) и «дендритная клетка 2» (ДК2) [Хоченков Д.А., 2010; Хоченков Д.А., Гаврилова М.В., 2012].

В ходе запуска иммунного ответа природа антигена определяет набор цитокинов, которые секретируются ДК. В итоге цитокиновое микроокружение формирует тип Т-клеточной реакции, в направлении которой пойдет дифференциация наивных предшественников. IL-12, IL-18, IL-23 и IFN типа 1 активируют Т-хелперы (Th) 1, тогда как IL-10 участвует в формировании регуляторных Т-лимфоцитов типа Treg и Th3. Было показано, что количество активированных TCR на поверхности Т-лимфоцитов оказывает влияние на выбор направления Т-клеточной дифференцировки. Для формирования Th1 необходима активация большого количества TCR на Т-клетке. Для развития Th2-лимфоцитов требуется небольшое количество TCR, экспрессия ДК OX-40L и присутствие IL-4 в окружающей клетку среде в момент взаимодействия ДК с наивным Т-лимфоцитом – Th0. Таким образом, тип дифференцировки Т-хелперов определяется силой антигенспецифического сигнала и цитокиновым микроокружением [Пашенков М.В., Пинегин Б.В., 2006; Ивашкин В.Т., 2008; Хоченков Д.А., Гаврилова М.В., 2012].

Известно, что ДК также участвуют в антигенной стимуляции В-лимфоцитов. Усиление пролиферации В-лимфоцитов, их дифференцировки в антителопродуцирующие клетки и секреция антител происходят в результате непосредственной активации В-клеток через поверхностную молекулу CD40 на ДК. В дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки участвует IL-12,

который синтезируется в ходе созревания ДК [Пашенков М.В., Пинегин Б.В., 2006; Хоченков Д.А., 2008; Сахно Л.В., Распай Ж.М., 2011].

#### **1.4. Участие дендритных клеток в формировании иммунологической толерантности**

Согласно современным представлениям, различают два вида иммунологической толерантности – центральную и периферическую. Поддержание и индукция обоих видов толерантности осуществляется за счет участия ДК. Центральная толерантность формируется за счет негативной селекции аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, в ходе которой немало важную роль играют ДК. Так, в ряде работ было показано, что ДК в культуре тимуса новорожденных мышей вызывали негативную селекцию тимоцитов. Однако вопрос об участии ДК в позитивной селекции Т-лимфоцитов все еще остается спорным и недостаточно изученным [Saunders D. et al., 1996; Yasutomo K. et al., 2000; Козлов В.А., 2005; Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2010].

Участие ДК в периферической толерантности определяется рядом факторов, таких как цитокиновое микроокружение, присутствие в нем регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), наличие на поверхности ДК молекул семейства В-7 [Сахно Л.В., Тихонова М.А., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2012].

Противовоспалительное цитокиновое микроокружение не способствует процессам созревания ДК и формированию адекватного иммунного ответа. Обработанные IL-10 ДК не способны созреть при действии ЛПС, вследствие чего они не способны инициировать Т-клеточный иммунный ответ. Подобное цитокиновое микроокружение формируется, например, в опухолевом очаге. На фоне опухолевого роста ДК дефектны в силу продукции опухолевыми клетками ряда цитокинов, таких как GM-CSF, M-CSF (*monocyte colony-stimulating factor*), IL-6, IL-10 и VEGF (*vascular endothelial growth factor*). P. Serafini et al. [2004] показали, что, несмотря на то, что GM-CSF является одним из ростовых факторов миелоидных ДК, при вакцинации мышей опухолевыми клетками, выделяющими

большое количество GM-CSF, формировались незрелые миелоидные ДК. IL-6, IL-8, TNF $\beta$  и M-CSF также угнетают созревание ДК. В частности, IL-6 участвует в поддержании ДК в незрелом состоянии в связи с активацией транскрипционного фактора STAT3. Одним из факторов, способных нарушать антигепрезентирующую функцию ДК, является VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), который секретируется различными видами опухолей. Увеличение плазменного уровня VEGF и снижение количества ДК в опухолевой ткани у онкологических больных коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Было также выяснено, что миелоидные и плазмоцитоидные ДК в солидных опухолях находятся на промежуточной стадии созревания и не способны активировать Т-клетки. Несмотря на обширные исследования в данной области, молекулярные механизмы дисфункции ДК при опухолевых процессах остаются не до конца выясненными [Козлов В.Ю., Черных Е.Р., 2010].

Периферическая толерантность может формироваться под влиянием Treg. Супрессорная активность данных клеток определяется не только поверхностной молекулой CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), но и внутриклеточным транскрипционным фактором Foxp3, высокая экспрессия которого является определяющим маркером для данного типа клеток. Межклеточная кооперация ДК и Treg имеет взаимное влияние. Так, Treg способны секретировать IL-10, угнетая при этом процессы созревания ДК; способны изменять секрецию цитокинов зрелыми ДК и экспрессию ими поверхностных костимулирующих маркеров [Lange C. et al., 2007; Saei A. et al., 2013]. В свою очередь, ДК необходимы для поддержания процессов размножения популяции Treg-клеток и их последующей активации.

Еще один вид толерантности – клеточная анергия. Ее также опосредуют регуляторные Т-клетки – Treg. Treg конкурирует с другими Т-клетками за взаимодействие с антигеном, опережая их в процессе связывания с АПК и, тем самым, препятствуя формированию иммунологического синапса. По сути, Treg посылает сигнал, который не позволяет ДК презентировать чужеродный антиген Т-лимфоциту. Вместе с этим, Treg может инактивировать ДК, посылая сигнал,

который не позволяет ей «оповещать» другие Т-клетки о наличии чужеродного антигена или «вынуждает» АПК подавлять активность антигенраспознающих Т-клеток посредством секреции ингибиторных сигнальных молекул – IL-10 и TGF $\beta$ . И, наконец, Treg может использовать АПК как «плацдарм» для установления тройного контактного взаимодействия с Т-клеткой-мишенью, присоединившейся к АПК. После этого Treg инъецирует ингибиторные молекулы (IL-10 и TGF $\beta$ ) непосредственно в Т-клетку или посылает ей сигналы, распространяющиеся на короткие расстояния, путем взаимодействия негативного активатора сигнальной трансдукции CTLA-4 Treg с молекулами костимуляции [Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2012].

### **1.5. Роль дендритных клеток в распознавании микобактерий туберкулеза**

В распознавании компонентов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* принимают участие TLR2, TLR4, маннозный рецептор, CD11b (Mac-1), CD11c и DC-SIGN, расположенные на поверхности ДК [Srivastava V. et al., 2009]. Лигандом для TLR2, TLR4 является липоарабиноманнан (ЛАМ) клеточной стенки микобактерий туберкулеза. Он заякорен на плазматической мембране, пронизывает клеточную стенку и выходит на ее поверхность. ЛАМ представлен гетерогенной смесью высокомолекулярных липополисахаридов, углеводным компонентом которых служат разветвленные полимеры арабинозы и маннозы, а липидная часть состоит из производных (диацилглицеролов) пальмитиновой и туберкулостеариновой кислот [Маянский А.Н., 2001; Есимова И.Е. и соавт., 2012].

С участием акцессорных молекул CD14 и MD2 рецептор TLR4 формирует высокоаффинный комплекс для распознавания ЛПС. ЛПС вначале связывается с ЛПС-связывающим протеином, который переносит его к мембранному рецептору CD14. Молекула CD14 существует также в растворимой форме и способна взаимодействовать с ЛПС в растворе. Однако мембранная форма этой молекулы представлена лишь очень коротким внутриклеточным участком, который не

имеет сайтов фосфорилирования и соответственно не способен проводить активационный сигнал внутрь клетки. Другая акцессорная молекула MD2 не является мембранным рецептором, а физически взаимодействует с внеклеточными доменами TLR4 в составе рецепторного комплекса и абсолютно необходима для ответа на ЛПС. Мыши, дефицитные по гену MD2, утрачивают способность отвечать на ЛПС, также, как и при удалении самого гена TLR4 [Симбирцев А.С., 2005].

Для проведения сигнала TLR2 требуются в качестве корецепторов TLR1 и TLR6, с которыми он образует гетеродимер. TLR1 способен распознавать триацильные липопептиды и ЛАМ, а TLR6 участвует в детекции диацильных липопептидов. При этом гомодимеры TLR1 и TLR6 функционально неактивны [Симбирцев А.С., 2005; Бехало В.А. и соавт., 2009]. В процессе распознавания микобактериальных лигандов TLR2 взаимодействует с акцессорными молекулами CD14, CD36, интегрином CD11b-CD18 и ганглиозидом CD1a [Drage M.G. et al., 2009].

Поверхностный рецептор DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin receptor*), наравне с остальными, участвует в распознавании *M. tuberculosis*. Молекула DC-SIGN выполняет функции рецептора для захвата различных патогенов (в число которых помимо *M. tuberculosis* входит *H. pylori*, ВИЧ-1, вирусы гепатита С и цитомегалии). Более того, она является молекулой клеточной адгезии при взаимодействии с Т-клетками и необходима для миграции ДК. Лигандами для DC-SIGN при микобактериальной инфекции являются ЛАМ, липоманнан, арабиноманнан и 19-кДа антиген [Леплина О.Ю. и соавт., 2009; Сахно Л.В. и соавт., 2012].

Исследования показали, что внутриклеточный сигнал от DC-SIGN также способен регулировать цитокиновую секрецию [Barreiro L. et al., 2006; Srivastava V. et al., 2009]. Было обнаружено, что при взаимодействии *M. tuberculosis* с TLR2 и DG-SINGR1 на поверхности ДК последующий внутриклеточный сигнал регулируется экспрессией молекул SOCS1. Белки семейства SOCS влияют на уровень секреции цитокинов и цитокиновых рецепторов. На сегодняшний день

описано 8 членов этого семейства, имеющих сходное строение: центральный гомологичный Scf домен 2, N-терминальный домен, C-терминальный домен (SOCS-box), состоящий из 40 аминокислотных остатков. V. Srivastava [2009] показали, что распознавание *M. tuberculosis* через DG-SINGR1 на поверхности ДК ведет к повышению уровня белка SOCS1 и снижению продукции IL-12. При этом сигнал с DG-SINGR1 обуславливал секрецию иммуносупрессорного цитокина IL-10. Противоположные процессы наблюдались при активации TLR2 на поверхности ДК [Tailleux L., 2005; Berrington W.R., Hawn T.R., 2007; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2012]. Как стало известно, уровень рецепторов DC-SIGN на поверхности ДК и альвеолярных макрофагов, полученных из бронхоальвеолярного лаважа больных туберкулезом легких, был повышенным по сравнению со здоровыми донорами [Sakamoto K., 2012] что, возможно, является одной из причин неадекватного иммунного ответа при данной патологии.

Рецептор NOD2 ДК распознает мурамилдипептид – компонент пептидогликана клеточной стенки микобактерий и грамположительных бактерий. Стимуляция рецептора способствует секреции  $\alpha$ -4-дефензинов, обладающих бактерицидной активностью, которые могут играть защитную роль при туберкулезе [Kobayashi K.S., 2005]. На сегодняшний момент нет никаких доказательств, что нарушения в системе NOD2-рецепторов изменяют восприимчивость организма к микобактериальной инфекции [Ferwerda G., 2005; Pel M.J. et al., 2013].

В связи с изложенным, распознавание ДК антигенов *M. tuberculosis* и последующая сигнальная трансдукция внутрь клетки являются ключевыми моментами для процессов созревания антигенпредставляющих клеток, синтеза провоспалительных цитокинов и запуска иммунного ответа.

## 1.6. Нарушение процессов активации дендритных клеток при туберкулезе легких

Из литературных источников известно, что у больных туберкулезом легких (ТЛ) отмечается функциональная недостаточность Th1-лимфоцитов. Подавление Th1-ответа формируется в результате подверженности клеток анергии и апоптозу [Уразова О.И., 2010]. Показано, что данный процесс формируется в результате дефицита секреции IL-2, который предохраняет активированные Т-клетки от апоптоза, препятствуя развитию иммунологической толерантности. В ходе более детального изучения иммунопатогенеза туберкулезной инфекции возникла новая гипотеза о механизмах подавления Th1-ответа, в основе которой лежит нарушение процессов презентации ДК микобактериальных антигенов Т-лимфоцитам [Сахно Л.В. и соавт., 2007; Уразова О.И. и соавт., 2010; Есимова И.Е. и соавт., 2012].

Уничтожение внутриклеточных микроорганизмов осуществляется в результате деятельности Th1-клеток, в то время как элиминация внеклеточных патогенов осуществляется с участием Th2-лимфоцитов. Механизмы, которые регулируют поляризацию иммунных реакций, являются определяющими для формирования адекватного иммунного ответа по Th1- или Th2-пути. При этом дисбаланс продукции Th1/Th2-ассоциированных цитокинов (IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-6) АПК, в том числе ДК, и другими клетками иммунной системы при ТЛ является основным патогенетическим фактором неэффективности антигенспецифического ответа при данной инфекции [Уразова О.И. и соавт., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2012].

В ответ на внедрение инфекционного агента через активацию рецепторного аппарата ДК начинают секретировать провоспалительные цитокины, в частности IL-12 и IL-18. Под влиянием цитокинов ускоряется процесс созревания и усиливаются антигенпрезентирующие свойства ДК. Однако микобактерии туберкулеза способны влиять и на секрецию IL-10, тем самым, ингибируя активность ДК и образование ими IL-12 [Demangel C., Britton W.J., 2000]. Ранее

проведенные исследования показали, что при ТЛ имеет место снижение секреции IL-12 [Хасанова Р.Р. и соавт., 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2010]. Недостаточный уровень секреции данного цитокина может лежать в основе Т-клеточного дефицита, характерного для туберкулезной инфекции. IL-12 и IL-18 обладают синергичным влиянием на Т-лимфоциты. Показано, что для адекватной продукции IFN $\gamma$  NK- и цитотоксическими Т-клетками требуется одновременное действие обоих цитокинов [Кетлинский С.А., 2005; Якушенко Е.В. и соавт., 2005].

В работе Е.Г. Чуриной и соавт. [2012] показано увеличение базальной и BCG-индуцированной секреции IL-10 Т-лимфоцитами с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> у больных инфильтративным ТЛ, что, возможно, также подавляет антигенпрезентирующие способности у «вновь прибывших» в очаг воспаления ДК. Повышение числа Т-лимфоцитов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> происходит в тимусе под влиянием ДК и свидетельствует об активации механизмов иммуносупрессии при ТЛ.

Из данных литературы следует, что антигены микобактерий туберкулеза способны распознаваться лектиновым рецептором С-типа DC-SIGN, экспрессируемым на поверхности ДК. Такое взаимодействие приводит к усилению секреции иммуносупрессорного цитокина IL-10, подавлению созревания и активации ДК, что в итоге опосредует выживание микобактерий и формирование новых ниш для распространения возбудителя. Данный рецептор распознает полисахаридные компоненты микобактериальной клеточной стенки и, скорее всего, необходим для компенсации ярко выраженной воспалительной реакции [Hickman S.P. et al., 2006].

Предполагается, что клеточная Th1-реакция формируется в результате быстрой секреции ДК IL-12, а последующая продукция IL-10 не способна модулировать иммунный ответ. Однако ДК, секретирующие IL-10, формируют реакцию иммунного Th2-ответа либо толерантности. Таким образом, актуальным является вопрос о кинетике продукции цитокинов в ходе иммунного ответа при туберкулезной инфекции [Hickman S.P. et al., 2006].

Исследования на модели хронического и острого гранулематозного воспаления у мышей показали различия в функциональных возможностях, фенотипе и расположении миелоидных CD11c<sup>+</sup>ДК в гранулеме. При остром гранулематозном воспалении CD11c<sup>+</sup> клетки в основном находятся в лимфоидной манжете гранулемы, экспрессируя большое количество молекул HLAII класса и костимуляторных молекул CD80 и CD86. При хроническом процессе ДК, локализуясь в основном в центре гранулемы, на своей поверхности имеют низкий уровень HLAII класса, высокую концентрацию ингибирующих T-клетки молекул PD (*programming death ligand*) – PD-L1 и PD-L2. Низкая продукция IFN $\gamma$  объясняет длительное выживание микобактерий в гранулеме. IFN $\gamma$  имеет решающее значение для активации макрофагов, в частности для синтеза активных форм азота и кислорода, необходимых для кислородного взрыва и слияния фаго- и лизосомы. Наряду с инфицированными макрофагами, ДК также могут выступать резервуаром микобактерий. Инфицированные *M. tuberculosis* ДК могут способствовать распространению заболевания и накапливаться в лимфоидных органах и гранулеме, что свидетельствует об отсутствии или подавлении эффективных механизмов уничтожения *M. tuberculosis* и формирования ниш для выживания микобактерий в участке инфицирования [Сахно Л.В. и соавт., 2012].

Процессы созревания ДК, генерированных от больных туберкулезом, характеризуются их нарушением. Для образования иммунологического синапса и достаточной активации T-лимфоцитов на поверхности ДК необходимо наличие всех молекул костимуляции. Однако в ходе инфицирования *M. tuberculosis* было выявлено, что уровень молекул костимуляции значительно снижается, но повышается уровень экспрессии маркеров CD14 и CD1a [Zuniga J. et al., 2012].

Известно, что предшественниками миелоидных ДК являются моноциты периферической крови. В литературе имеются данные о том, что при туберкулезной инфекции на моноцитах отмечается низкий уровень экспрессии молекул CD86, CD80 и HLA-DR [Сахно Л.В. и соавт., 2009; Сахно Л.В. и соавт., 2010].

В исследовании О.В. Темчуры и соавт. [2007] было обнаружено, что количество  $CD80^+$  моноцитов у больных ТЛ значительно ниже, чем у здоровых доноров. При этом у больных ТЛ количество  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, продуцирующих  $IFN\gamma$ , находилось в прямой корреляционной связи с количеством моноцитов, экспрессирующих  $CD80$ . Показано, что Th1/Th2-поляризация эффективно индуцируется костимуляцией через  $CD28$ , при этом продукция  $IFN\gamma$  зависит от взаимодействия  $CD28$  Т-лимфоцита с  $CD80$ -молекулами на поверхности АПК. Видимо, данный функциональный дефект моноцитов сохраняется на уровне зрелых ДК и, наряду с апоптозом Th1-клеток, может служить одним из механизмов нарушений Th1-клеточного ответа, эффективного при микобактериальной инфекции [Темчура О.В. и соавт., 2007].

В периферической крови больных туберкулезом выявлено увеличение содержания субпопуляций моноцитов, несущих поверхностные маркеры  $CD14^+CD16^+$ . Предполагается, что именно эта популяция клеток участвует в воспалительных процессах при многих заболеваниях. Однако при туберкулезной инфекции  $CD14^+CD16^+$  моноциты проявляют противовоспалительную (иммуносупрессорную) активность, что опосредовано их повышенной способностью к продукции  $IL-10$  и  $IL-6$  и дефицитом продукции  $IFN\gamma$  [Demangel C., Britton W.J., 2000].

Как уже указывалось выше, ДК человека конститутивно экспрессируют на своей поверхности молекулы семейства В-7, в частности В7-Н1 (PDL (*programming death ligand*) -1), В7-Н3, В7-Н4, и индуцибельно В7-DC (PDL-2). Данные лиганды подавляют пролиферацию Т-клеток и продукцию ими цитокинов, способствуя ускользанию микроорганизмов от иммунного ответа. Экспрессия PD-Ls на клеточной поверхности ДК является ключевым моментом для формирования периферической толерантности, и многие микроорганизмы используют данные структурные компоненты клетки для угнетения реакций со стороны эффекторных клеток. Так, в частности, было показано, что уровень экспрессии PD-L1 на поверхности ДК у больных ТЛ повышается в сравнении со здоровыми донорами. При этом на поверхности Т-лимфоцита при инфицировании

*M. tuberculosis* увеличивается уровень PD-1 рецепторов. Связывание данных молекул приводит к гибели антигенспецифических лимфоцитов или Т-клеточной анергии [Сахно Л.В. и соавт., 2012; Тыринова Т.В. и соавт., 2012].

Нельзя не отметить, что цитокины TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, GM-CSF присутствуют в хронической гранулеме, формируют ее провоспалительное микроокружение и стимулируют повышенную секрецию молекул семейства B-7 на клеточной мембране ДК [Schreiber H.A. et al., 2010].

Таким образом, в основе патогенеза ТЛ лежит нарушение клеточно-опосредованного иммунного ответа. Его механизмы, возможно, связаны с изменением функционирования ДК у больных ТЛ, что, скорее всего, опосредованно длительной персистенцией *M. tuberculosis*, нарушением презентации антигена, секрецией иммуносупрессорных цитокинов и появлением толерогенных ДК и иммуносупрессорных Т-лимфоцитов, способных индуцировать апоптоз Т-клеток и состояние Т-клеточной анергии [Уразова О.И. и соавт., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Есимова И.Е. и соавт., 2012]. Вместе с тем, данных о результатах исследований, посвященных комплексной оценке факторов дисрегуляции иммунного ответа на уровне дендритных клеток в аспекте различных клинико-патогенетических вариантов ТЛ, а также с учетом спектра лекарственной резистентности инфицирующего штамма, в доступной литературе нет, что определяет актуальность настоящей работы.

## Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Объект исследования

Критерием отбора пациентов в группу больных служило наличие впервые выявленного лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких (ТЛ) вне зависимости клинической формы туберкулезной инфекции (инфильтративный ТЛ, диссеминированный ТЛ). Количество обследованных больных составило 98 человек (69 мужчин и 29 женщин) в возрасте от 29 до 59 лет, средний возраст которых соответствовал  $43,10 \pm 10,46$  лет. Все пациенты поступали в Томскую областную туберкулезную клиническую больницу (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова), где проводился их клинический осмотр, сбор анамнеза, физикальные методы обследования и постановка диагноза. В зависимости от формы туберкулезной инфекции пациенты в дальнейшем направлялись во фтизиатерапевтическое отделение №1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева) и №2 (зав. отд. – Т.З. Малиновская).

Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Возбудитель туберкулеза выявлялся методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флуорохрома (аурамина). Для определения чувствительности к противотуберкулезным химиопрепаратам (методом абсолютных концентраций) производился посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2. Исследования проводились в бактериологической лаборатории Томского областного противотуберкулезного диспансера (гл. врач – С.П. Мишустин).

Все больные были обследованы до назначения им специфической противотуберкулезной химиотерапии. В исследование включались пациенты, не

имеющие выраженного интоксикационного синдрома, хронической декомпенсированной сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной, почечной недостаточности, декомпенсированного сахарного диабета, злокачественных новообразований и заболеваний крови, психических расстройств, системных аутоиммунных заболеваний, у женщин детородного возраста исключалась беременность.

Пациенты с впервые выявленным ТЛ были разделены на группы в зависимости от клинической формы заболевания – с инфильтративным ТЛ (ИТЛ) и диссеминированным ТЛ (ДТЛ), и в зависимости от лекарственной чувствительности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* – с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ). Учитывая спектр лекарственной чувствительности инфицирующего штамма *M. tuberculosis*, больные были разделены на группы с моно-, поли- и множественно лекарственно-устойчивым (МЛУ) ТЛ.

ИТЛ был диагностирован у 36 (36,73%) обследованных пациентов с ТЛ, ДТЛ – у 62 (63,27%). ЛЧТЛ был выявлен у 48 (48,98%), ЛУТЛ – у 50 (51,02%) обследованных больных ТЛ, из них с моно-, полирезистентностью и МЛУ *M. tuberculosis* – соответственно у 23 (23,47%), 12 (12,24%) и 15 (15,31%) пациентов.

Группу сравнения составили здоровые доноры (12 женщин и 38 мужчин), сопоставимые с группой больных ТЛ по возрасту (средний возраст  $41,31 \pm 7,47$  лет). Доноры на момент исследования были клинически здоровы, в анамнезе отсутствовали тяжелая легочная патология, аллергические заболевания, обострения хронических воспалительных процессов, инфекционных заболеваний, наследственные и психические болезни, а также злоупотребления курением, алкоголем, наркотическая зависимость.

Экспериментальные исследования проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории, лаборатории биологических моделей СибГМУ, лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

## **2.2. Материал исследования**

В работе были исследованы дендритные клетки, трансформированные из моноцитов периферической крови здоровых доноров и больных ТЛ. Взятие периферической крови осуществлялось утром натощак путем пунктирования локтевой вены в количестве 20 мл, кровь стабилизировалась гепарином (25 ЕД/мл). Подсчет общего количества лейкоцитов, моноцитов у здоровых доноров осуществлялся с использованием гематологического анализатора «МЕК 6400» (Mihonkohden, Япония) на базе клиничко-диагностической лаборатории МАУЗ «Поликлиника №3» г. Томска (зав. лаборатории – Мирошниченко Н.М.). У больных ТЛ подсчет общего количества лейкоцитов и моноцитов осуществлялся на момент поступления в Томскую областную туберкулезную клиническую больницу с использованием гематологического анализатора «Hemalite 1260» (Dixon, Россия).

## **2.3. Методы исследования**

### **2.3.1. Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови**

Венозную кровь разбавляли средой RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 2. На дно центрифужной пробирки вносили 10 мл фиколл-урографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>; «ПанЭко», Россия), поверх которого наслаивали кровь. Соотношение фиколл-урографина и разбавленной крови приходилось как 1 к 3, далее центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин в условиях комнатной температуры. Слой мононуклеаров, образовавшийся на разделе фаз в виде интерфазного кольца, собирали в стерильную пробирку и дважды отмывали средой RPMI-1640. Полученную взвесь мононуклеарных клеток доводили средой RPMI1640 до 1 мл и в дальнейшем использовали для выделения фракции моноцитов.

### **2.3.2. Выделение моноцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов путем градиентного центрифугирования**

К мононуклеарной взвеси клеток добавляли стандартный изотонический раствор перколла (SIP), доводя объем в пробирке до 2,5 мл. В последующем производили наслоение 5 мл 45% раствора SIP и 25% раствора SIP в количестве 2 мл. Центрифугирование осуществляли в течение 45 мин при 4000 об/мин и 4<sup>0</sup>С. В результате получали два интерфазных кольца, из которых верхнее содержало моноцитарную фракцию клеток. Промывку клеток совершали один раз средой RPMI-1640 путем ресуспендирования и последующего осаждения клеток центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Объем клеточной суспензии доводили до 1 мл полной питательной средой и осуществляли подсчет клеток стандартным гематологическим методом в камере Горяева. Жизнеспособность моноцитов оценивали, смешивая 0,1 мл клеточной взвеси с равным объемом 0,5% раствора трипанового синего, и рассчитывали по количеству клеток за вычетом «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Результаты выражали в %. Жизнеспособность выделенных клеток составляла более 95%.

### **2.3.3. Трансформация моноцитов в дендритные клетки**

В ячейку 24-луночного планшета вносили  $1 \times 10^6$  клеточной взвеси, содержащей моноциты, и добавляли 1 мл полной питательной среды. Клеточную суспензию помещали на 1 ч в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37<sup>0</sup>С и 5% CO<sub>2</sub>, в дальнейшем производили замену полной питательной среды в объеме 1 мл и добавляли неспецифические стимуляторы – цитокины (интерлейкин (IL) 4 и гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) («Sigma», USA) в концентрации 20 нг/мл). На 3-й день культивирования удаляли  $\frac{3}{4}$  среды и вносили равное количество полной питательной среды с цитокинами.

При стимуляции моноцитов с помощью IL-4 и GM-CSF в течение 2-3 дней в культуральной среде появлялись первые незрелые ДК (Рисунок 2а).

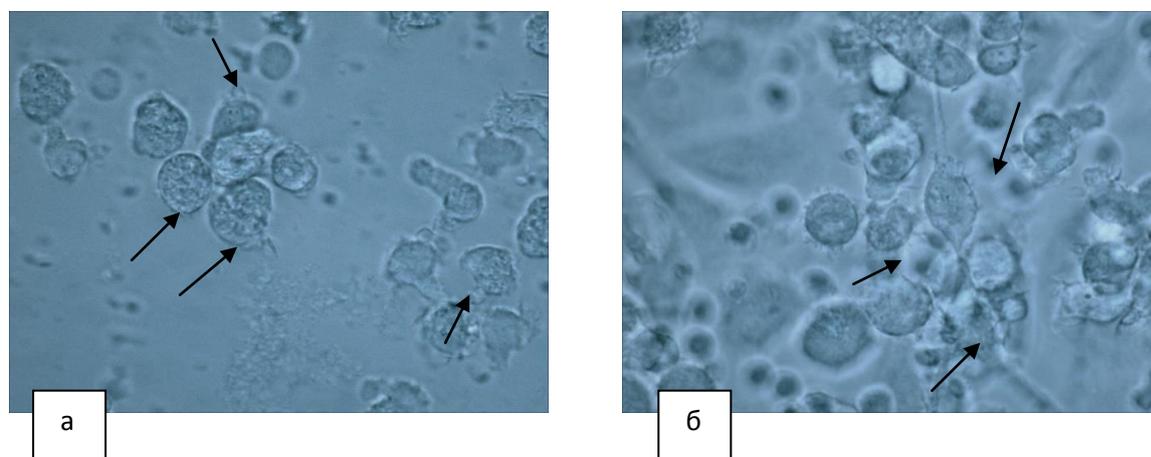


Рисунок 2. Трансформация дендритных клеток из моноцитов периферической крови (увеличение x250): а – незрелые дендритные клетки в полной питательной среде на 3-й день культивирования; б – зрелые («отросчатые») дендритные клетки в полной питательной среде на 6-й день культивирования.

Моноциты утрачивали адгезионную способность к пластику, из их монослоя формировались первые скопления клеток. В ходе такой трансформации на 3-и сутки на поверхности клеток появлялись отростки. На 5-й день инкубации производили повторную замену полной питательной среды с добавлением стимулятора – липополисахарида – ЛПС («Sigma», USA) в концентрации 5 мг/мл. На 6-е сутки культивирования из моноцитов крови формировались зрелые дендритные клетки (ДК, Рисунок 2б) [Чкадуа Г.З. и соавт., 2010]. Для исследования поверхностных маркеров ДК отбирались на 7-е сутки культивирования. Измерение концентрации цитокинов осуществляли в супернатантах ДК также на 7-е сутки культивирования.

#### **2.3.4. Определение поверхностных маркеров CD80, CD86, CD-209, HLA-DR и TLR2 на дендритных клетках с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии**

*Принцип метода* заключается в определении рассеивания света лазерного луча при прохождении через него дендритных клеток, окрашенных моноклональными антителами, меченными флуоресцентными метками.

Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием моноклональных антител к CD209, CD80, CD86, HLA-DR и TLR2 («eBioscience», USA). Для этого клетки переносили в пробирки для проточной цитометрии, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре и промывали в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4). Удалив надосадочную жидкость, вносили раствор фосфатно-солевого буфера, содержащего необходимую концентрацию моноклональных антител. Инкубирование осуществляли в течение 30-45 мин в темноте при температуре 4<sup>0</sup>С. Последующую промывку осуществляли при тех же условиях, удаляли надосадочную жидкость. Вносили 1 мл фосфатно-солевого буфера, ресуспендировали на вортексе и производили измерение образцов клеточных суспензий на проточном цитометре («Beckman coulter 2», USA).

Настройку лазерного проточного цитометра осуществляли таким образом, что бы на точечном рисунке в координатах SSC-A (боковое светорассеяние, характеризующее цитоплазматические и мембранные особенности клетки) / FSC-A (малое угловое светорассеяние, характеризующее размер клетки) выделялось «облако» дендритных клеток – высокогранулярных и крупных по размеру (Рисунок 3). Затем из данной популяции клеток на графике гейтом №1 отмечали ту, что несет общий маркер дендритных клеток – CD209 (Рисунок 4). Сбор данных осуществляли до тех пор, пока не набиралось 10 000 событий (т.е. 10 000 клеток). Далее гейт №1 применяли к графику, построенному в параметрах флуоресценции FITC-A (CD86; HLA-DR) / PE-A (CD80; TLR2). И на основании

этого в дальнейшем осуществляли анализ популяции ДК несущих маркер CD86, CD80, CD80/CD86, HLA-DR, TLR2.

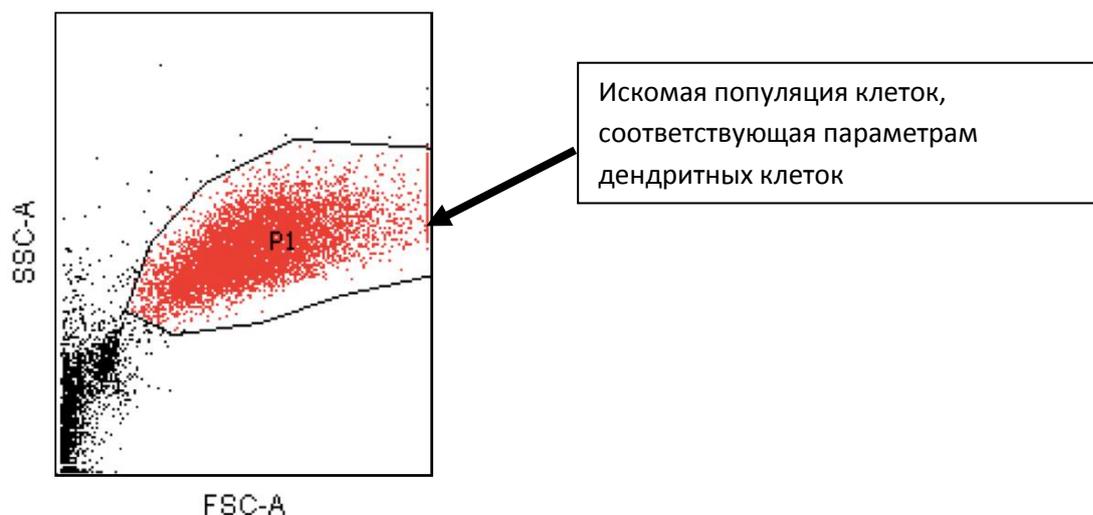


Рисунок 3. Выделение «облака» дендритных клеток на основе параметров SSC-A/FSC-A. Дендритные клетки – популяция высокогранулярных, крупных по размеру клеток.

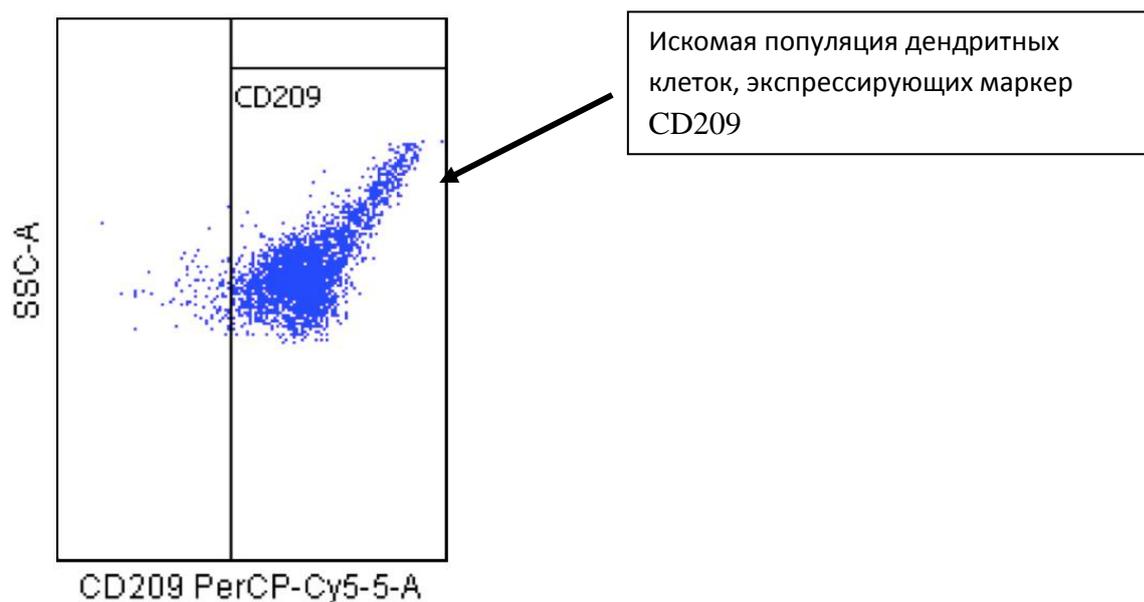


Рисунок 4. Выделение гейта дендритных клеток по сигналам бокового светорассеивания (SSC-A) и интенсивности флуоресценции основного маркера CD209.

## 2.3.5. Оценка секреторной активности дендритных клеток

### 2.3.5.1. Измерение концентрации IL-18 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток

Для определения IL-18 в супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA) (eBioscience, USA).

*Принцип метода.* Суть метода заключается в связывании молекул цитокина с адсорбированными в ячейках планшета антителами. Данный комплекс взаимодействует с конъюгатом, связанный с биотином, избыток которого в последующем удаляется после инкубации при промывке. К сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» добавляется субстратный раствор, позволяющий образовывать окрашенный комплекс. Реакция останавливается добавлением кислоты. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей продукты жизнедеятельности клеток («0 доза»), и стандартных растворов цитокина с известной концентрацией.

*Ход определения.* Супернатант для исследования отбирался на 7-е сутки культивирования дендритных клеток. В соответствующие ячейки последовательно добавляли по 100 мкл стандартов. В оставшиеся ячейки помещали равное количество супернатанта и буфера для разведения образцов. Вносили 50 мкл биотинового конъюгата и инкубировали планшет при комнатной температуре при интенсивном помешивании в течение 2 ч. Промывку осуществляли автоматическим вошером 3 раза. В последующем в каждую ячейку добавляли по 50 мкл конъюгата стрептовидин-HRP и инкубировали еще 1 ч при тех же условиях. Субстратный раствор тетраметилбензидина (ТМБ) вносили в количестве 100 мкл после 3-кратной промывки. Реакцию останавливали добавлением в ячейки раствора 0,5 М серной кислоты (стоп-реагент).

Регистрацию результатов осуществляли на фотометре-анализаторе «Multiscan EX» (Финляндия), измеряя оптическую плотность содержимого ячеек планшета при длине волны 450 и 490 нм. На основании калибровочной кривой вычисляли концентрацию цитокина. Результаты выражали в пг/мл.

### **2.3.5.2. Измерение концентрации IL-12 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток**

Для определения уровня IL-12 в супернатантах дендритных клеток использовали твердофазный иммуноферментный метод (ELISA) (eBioscience, USA).

*Принцип метода.* Молекулы цитокина взаимодействуют с мышиными моноклональными антителами, сорбированными на твердой фазе микропланшета. С данным комплексом конъюгируют кроличьи поликлональные антитела, специфичные против человеческого цитокина. Избыток последних удаляется в результате промывки. К сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» добавляется окрашивающий раствор. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с помощью стандартных растворов и цитокина с известной концентрацией.

*Ход определения.* Процедура иммуноферментного анализа осуществлялась согласно инструкции, предлагаемой производителем тест-системы (eBioscience, USA). Для этого в соответствующие ячейки вносили стандартные растворы известной концентрации. В ячейки для образцов вносили 100 мкл супернатанта и 50 мкл биотинового конъюгата, инкубация осуществлялась при 37<sup>0</sup>С в течение 2 ч. Конъюгат стрептовидина – HRS в объеме 50 мкл вносили после промывки образцов и инкубировали в течение 1 часа при условиях комнатной температуры и интенсивном помешивании. После очередного цикла промывок в лунки вводили 100 мкл окрашивающего раствора ТМБ. Реакцию останавливали добавлением в

ячейки стоп-раствора (0,5 М серная кислота). Регистрация оптической плотности содержимого ячеек планшета и концентрация цитокина рассчитывались аналогично в разделе 2.3.5.1.

### **2.3.6. Приготовление ядерных лизатов дендритных клеток для определения содержания внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB**

*Ход определения.* Клеточную взвесь содержащую  $1 \times 10^6$  клеток переносили в пробирки типа «эппендорф» и осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 4<sup>0</sup>С, супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл холодного фосфатно-солевого/ингибирующего раствора, центрифугирование производили при тех же условиях. Добавление холодного гипотонического раствора (*Hypotonic buffer*) в количестве 500 мкл осуществляли после деконтации супернатанта и в течение 15 мин инкубировали на льду. Последующее центрифугирование было необходимо для отделения цитоплазматической фракции. Холодный буфер для ядерной экстракции (*Nuclear extraction buffer*), содержащий протеазные и фосфатазные ингибиторы, вносили в объеме 500 мкл и тщательно смешивали клеточную взвесь, используя вортекс. В течение последующих 15 мин пробы оставляли на льду. Ядерную клеточную фракцию получали путем центрифугирования при максимальной скорости вращения – 11 000 об/мин и 4<sup>0</sup>С в течение 10 мин. Аликвоты хранили при -80<sup>0</sup>С до следующего анализа.

### **2.3.7. Определение содержания внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в ядерных лизатах дендритных клеток**

*Ход определения.* Для определения уровня внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB в ядерных лизатах дендритных клеток использовали набор NF-κB (human p50/p65) Combo Transcription Factor Assay Kit (USA). Исследование проводилось методом иммуноферментного анализа. В 96-

луночный планшет в ячейки для стандарта вносили по 100 мкл буфера, связывающего транскрипционный фактор, и по 90 мкл буфера – в ячейки для исследуемых образцов. В последние также вносили образцы по 10 мкл, уравнивая объем во всех лунках. Инкубацию осуществляли в течение 2 ч при 4<sup>0</sup>С. Промывку осуществляли пятикратно промывочным раствором в объеме 200 мкл. Разбавленные антитела к NF-κB вносили в соответствующие лунки, за исключением стандартов. После часовой инкубации при комнатной температуре производили промывку лунок промывочным раствором при тех же условиях и вносили 100 мкл вторичных антител. Образцы выдерживали при комнатной температуре в течение часа и тщательно промывали промывочным раствором 5 раз. В пробы вносили окрашивающий раствор (*Transcription factor developing solution*) в объеме 100 мкл и инкубировали 15-40 мин в темноте. Для остановки реакции добавляли 100 мкл стоп-реагента.

Измерения концентрации производили на фотометре-анализаторе «Multiscan EX» (Финляндия) при длине волны 450 нм. Внутриклеточную концентрацию транскрипционного фактора рассчитывали в процентах относительно контрольного образца.

#### **2.4. Статистический анализ результатов исследования**

Для оценки полученных результатов использовали программу Statistica for Windows Version 2012 (StatSoft Inc., США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Было показано, что все количественные признаки в группах сравнения не имели нормального распределения. В связи с этим, для сравнения независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах вычисляли медиану, 25%-й и 75%-й квартили. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05. В случае, если данный уровень значимости не

достигался, принималась нулевая гипотеза. С помощью ранговой корреляции Спирмена оценивали степень зависимости между различными параметрами внутри исследуемых групп. При уровне значимости менее 0,05 корреляцию считали значимой.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких

##### 3.1.1. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

При анализе количественных параметров периферической крови у больных с впервые выявленным туберкулезом легких (ТЛ) вне зависимости от клинической формы заболевания было установлено увеличение общего количества лейкоцитов в среднем в 1,6 раза по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров. При этом наиболее значимое увеличение общего числа лейкоцитов было зарегистрировано у больных с диссеминированным туберкулезом легких (ДТЛ) (Таблица 1).

Таблица 1

Показатели периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания,

Me (Q1-Q3)

Исследуемые параметры	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Инфильтративный (n=36)	Диссеминированный (n=62)
1	2	3	4
Общее количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	5,70 (5,00-5,70)	8,20 (6,70-8,70) $p_1 < 0,05$	9,95 (8,85-10,80) $p_1 < 0,01$ ; $p_2 < 0,05$
Содержание моноцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	0,25 (0,15-0,38)	0,40 (0,30-0,60) $p_1 < 0,001$	0,40 (0,30-0,50) $p_1 < 0,001$

## Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Содержание моноцитов в крови, %	4,21 (3,81-5,00)	5,60 (5,00-6,50) $p_1 < 0,01$	4,90 (3,68-6,70) $p_1 < 0,05$
Количество CD209 <sup>+</sup> дендритных клеток в культуральных суспензиях, %	20,83 (17,20-24,50)	35,10 (28,98-51,20) $p_1 < 0,05$	39,20 (25,95-68,73) $p_1 < 0,05$

*Примечание.* Здесь и в таблицах 4, 7:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – по сравнению с соответствующими параметрами у больных с инфильтративным туберкулезом легких.

Анализ содержания моноцитов в периферической крови выявил статистически значимое увеличение как абсолютного, так и относительного числа данных клеток у больных ТЛ по сравнению с параметрами в контрольной группе. Так, абсолютное содержание моноцитов в крови у больных с инфильтративным и диссеминированным ТЛ превышало значения в группе здоровых доноров в среднем в 1,6 раза (Таблица 1).

Для достижения цели исследования в настоящей работе был использован методический прием культивирования моноцитов крови в специальных условиях, позволяющих им трансформироваться через определенное время в дендритные клетки. Собственно количественный «выход» дендритных клеток (количество (%) клеток, несущих поверхностный маркер CD209 (маркер дендритных клеток), от общего количества моноцитов, подвергнутых культивированию) является одним из параметров, характеризующих трансформационную способность моноцитов крови [Leon B. et al., 2005].

Согласно полученным данным, у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы заболевания количество CD209-позитивных клеток в культуре оказалось выше соответствующих параметров в группе здоровых доноров в среднем в 1,8 раза (Таблица 1).

### 3.1.2. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)

Согласно полученным данным общее количество лейкоцитов у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный или лекарственно-устойчивый) значимо превышало соответствующие параметры в группе здоровых доноров в среднем в 1,5 раза (Таблица 2).

Таблица 2

Показатели периферической крови и культуральных суспензий у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый), Ме (Q1-Q3)

Исследуемые параметры	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный (n=48)	Лекарственно-устойчивый (n=50)
Общее количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	5,70 (5,00-5,70)	8,45 (6,70-10,50) $p_1 < 0,05$	8,50 (7,20-9,20) $p_1 < 0,05$
Содержание моноцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	0,25 (0,15-0,38)	0,40 (0,30-0,60) $p_1 < 0,05$	0,50 (0,38-0,53) $p_1 < 0,05$
Содержание моноцитов в крови, %	4,21 (3,81-5,00)	5,30 (4,45-6,55) $p_1 < 0,05$	5,50 (4,48-6,83) $p_1 < 0,001$
Количество CD209 <sup>+</sup> дендритных клеток в культуральных суспензиях, %	20,83 (17,20-24,50)	35,10 (27,58-63,65) $p_1 < 0,05$	38,48 (28,88-80,93) $p_1 < 0,05$

*Примечание.* Здесь и в таблицах 5, 8:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

Абсолютное количество моноцитов в крови у больных с лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ оказалось выше, чем у здоровых

лиц. Относительное количество моноцитов в крови у пациентов с лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ) и у больных с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) превышало контрольные значения (в среднем в 1,3 раза) (Таблица 2).

При исследовании количественных параметров культуральных суспензий было выявлено равнозначное увеличение процентного содержания дендритных клеток, трансформированных из моноцитов крови, в группе больных с ЛУТЛ и ЛЧТЛ по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров в среднем 1,7 раза (Таблица 2).

### **3.1.3. Количественные параметры периферической крови и культуральных суспензий у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis***

Анализ общего количества лейкоцитов крови у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких (ЛУТЛ) позволил установить увеличение данного показателя относительно параметров в группе здоровых лиц у всех обследованных пациентов вне зависимости от спектра устойчивости инфицирующего штамма *M. tuberculosis* (Таблица 3). Наиболее значимое повышение числа лейкоцитов в крови (в среднем в 2 раза) было зарегистрировано у больных с монорезистентным ЛУТЛ.

При исследовании относительного и абсолютного числа моноцитов в крови также было зарегистрировано более высокое содержание данных клеток у больных ТЛ по сравнению с параметрами в группе контроля, за исключением больных с множественно лекарственно-устойчивым (МЛУ) ТЛ, у которых оно было сопоставимым с нормой. Обращал на себя внимание и тот факт, что относительное и абсолютное количество моноцитов у больных МЛУ ТЛ оказалось ниже, чем у пациентов с моно- и полирезистентным ЛУТЛ (Таблица 3). При этом у пациентов, выделяющих МЛУ-штаммы *M. tuberculosis*, регистрировалось наибольшее (по сравнению с контрольными значениями)

количество CD209-позитивных клеток в культуре. Так, содержание дендритных клеток у больных с МЛУ ТЛ превышало соответствующие значения у больных с моно- и полирезистентным ТЛ в 2,0 и 1,6 раза соответственно (Таблица 3).

Таблица 3

Количественные показатели периферической крови и культуральных суспензий у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, Me (Q1-Q3)

Исследуемые параметры	Здоровые доноры (n=50)	Больные с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких		
		Монорезистентный (n=23)	Полирезистентный (n=12)	Множественно лекарственно-устойчивый (n=15)
Общее количество лейкоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	5,70 (5,00-5,70)	11,50 (9,90-12,40) $p_1 < 0,001$	8,80 (8,20-9,20) $p_1 < 0,001$	8,10 (7,80-8,10) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,05$ ; $p_3 < 0,05$
Содержание моноцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	0,25 (0,15-0,38)	0,50 (0,45-0,60) $p_1 < 0,001$	0,50 (0,40-0,55) $p_1 < 0,001$	0,30 (0,20-0,30) $p_2 < 0,05$ ; $p_3 < 0,05$
Содержание моноцитов в крови, %	4,21 (3,81-5,00)	6,90 (5,68-7,83) $p_1 < 0,001$	6,40 (4,75-6,70) $p_1 < 0,001$	4,20 (3,90-4,70) $p_2 < 0,05$ ; $p_3 < 0,05$
Количество CD209 <sup>+</sup> дендритных клеток в культуральных суспензиях, %	20,83 (17,20-24,50)	30,55 (27,61-35,15) $p_1 < 0,05$	37,60 (24,90-38,00) $p_1 < 0,001$	61,13 (49,35-86,65) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$ ; $p_3 < 0,001$

*Примечание.* Здесь и в таблицах 6, 9:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – по сравнению с соответствующими показателями у больных с монорезистентным ЛУТЛ;  $p_3$  – по сравнению с соответствующими показателями у больных с полирезистентным ЛУТЛ.

### 3.2. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких

#### 3.2.1. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

Анализ поверхностного фенотипа дендритных клеток (ДК) выявил увеличение относительно соответствующих параметров у здоровых доноров числа клеток, экспрессирующих маркер CD80, как у больных с ИТЛ, так и с ДТЛ. Так, количество CD80<sup>+</sup> ДК у больных с ИТЛ и ДТЛ оказалось практически в 2 раза выше соответствующих значений в группе здоровых доноров (Таблица 4).

Таблица 4

Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me (Q1-Q3)

Количество дендритных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, %	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Инфильтративный (n=36)	Диссеминированный (n=62)
CD80	1,30 (0,82-1,91)	2,50 (0,98-4,55) p <sub>1</sub> <0,05	2,60 (0,60-5,65) p <sub>1</sub> <0,05
CD86	60,35 (48,05-71,25)	31,70 (24,10-35,60) p <sub>1</sub> <0,001	43,90 (37,40-45,10) p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>2</sub> <0,05
CD80/86	46,85 (43,47-56,51)	27,04 (15,90-41,07) p <sub>1</sub> <0,05	26,14 (16,05-40,60) p <sub>1</sub> <0,05
TLR2	3,73 (3,70-3,95)	1,40 (0,65-2,89) p <sub>1</sub> <0,001	2,50 (1,15-4,41) p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>2</sub> <0,05

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
HLA-DR	78,50 (64,70-80,95)	95,70 (92,50-98,00) $p_1 < 0,05$	92,00 (91,90-96,00) $p_1 < 0,05$

При исследовании количества CD86-позитивных ДК и ДК, несущих на своей поверхности обе молекулы костимуляции (CD80 и CD86), было зарегистрировано их снижение у всех обследованных больных ТЛ вне зависимости от клинической формы заболевания по сравнению с соответствующими значениями у здоровых доноров. При этом более выраженное снижение количества ДК, несущих на своей поверхности маркер CD86, отмечалось в группе больных ИТЛ (Таблица 4).

Сравнительный анализ количества ДК, экспрессирующих TLR2, позволил установить снижение числа TLR2-позитивных клеток у больных ИТЛ и ДТЛ в 2,7 и 1,5 раза соответственно по сравнению со значениями в группе контроля (Таблица 4).

Количество HLA-DR-позитивных ДК оказалось выше нормы у больных как ИТЛ, так и ДТЛ, в среднем в 1,2 раза по сравнению с соответствующими параметрами у здоровых лиц (Таблица 4).

### **3.2.2. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)**

Согласно полученным данным, относительное содержание в культуре ДК с фенотипом CD80<sup>+</sup> у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый) оказалось выше параметров в группе здоровых доноров (в 2,4 и 3,0 раза соответственно) (Таблица 5).

Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый), Me (Q1-Q3)

Количество дендритных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, %	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный (n=48)	Лекарственно-устойчивый (n=50)
CD80	1,30 (0,82-1,91)	2,60 (2,00-4,60) $p_1 < 0,05$	3,30 (1,30-6,60) $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$
CD86	60,35 (48,05-71,25)	32,85 (16,40-42,60) $p_1 < 0,01$	37,10 (20,70-62,65) $p_1 < 0,01$
CD80/86	46,85 (43,47-56,51)	26,14 (15,40-42,54) $p_1 < 0,05$	26,59 (16,05-40,85) $p_1 < 0,05$
TLR2	3,73 (3,70-3,95)	0,95 (0,60-2,15) $p_1 < 0,01$	2,70 (2,47-4,32) $p_1 < 0,05; p_2 < 0,05$
HLA-DR	78,50 (64,70-80,95)	95,00 (91,00-97,80) $p_1 < 0,01$	93,35 (87,50-99,00) $p_1 < 0,01$

Напротив, количество ДК, экспрессирующих на своей поверхности молекулу CD86, у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания оказалось в среднем в 1,7 раза ниже контрольных значений, относительно параметров у здоровых доноров (Таблица 5).

Анализ процентного содержания ДК с фенотипом CD80<sup>+</sup>86<sup>+</sup> показал его снижение у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания в среднем в 1,8 раза относительно параметров у здоровых доноров. При этом статистически значимых его различий между группами больных с лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ не было зарегистрировано (Таблица 5).

При исследовании количества ДК, несущих на своей поверхности TLR2, у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания было зарегистрировано снижение числа данных клеток, относительно параметров в группе здоровых

доноров. При этом наиболее выраженное снижение числа TLR2-позитивных ДК было зарегистрировано в группе больных с ЛЧТЛ (Таблица 5).

Сравнительный анализ количества ДК с фенотипом HLA-DR<sup>+</sup> показал повышение данного параметра у больных ТЛ вне зависимости от варианта заболевания в среднем в 1,2 раза относительно аналогичных значений в группе здоровых доноров (Таблица 5).

### **3.2.3. Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis***

Как показали проведенные исследования, процентное содержание CD80-позитивных ДК у больных ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* оказалось выше соответствующих параметров в группе здоровых доноров только у больных с полирезистентным и МЛУ ТЛ (в 2,5 и 4,2 раза) (Таблица 6). При этом у пациентов с монорезистентным ТЛ число ДК, экспрессирующих на мембране маркер CD80, соответствовало контрольным значениям (Таблица 6).

Анализ содержания CD86-позитивных ДК и ДК, экспрессирующих обе молекулы костимуляции (CD80 и CD86), у больных ЛУТЛ выявил снижение данных показателей в среднем в 1,7 и 1,8 раза соответственно по сравнению с соответствующими значениями в группе здоровых доноров (Таблица 6). При этом наименее выраженным снижением числа CD86<sup>+</sup> ДК было при МЛУ ТЛ (Таблица 6).

При анализе количества ДК в культуре, несущих на своей поверхности TLR2, было выявлено значительное его увеличение по сравнению с контрольными значениями числа данных клеток у больных с МЛУ ТЛ (Таблица 6).

Характеристика рецепторного аппарата дендритных клеток у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, Me (Q1-Q3)

Количество дендритных клеток, экспрессирующих соответствующие CD-маркеры, %	Здоровые доноры (n=50)	Больные с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких		
		Монорезистентный (n=23)	Полирезистентный (n=12)	Множественно лекарственно-устойчивый (n=15)
CD80	1,30 (1,12-1,91)	1,50 (1,30-1,70)	3,30 (2,10-7,00) p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>2</sub> <0,01	5,50 (0,90-5,80) p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,05
CD86	60,35 (48,05-71,25)	34,30 (11,60-37,10) p <sub>1</sub> <0,001	32,75 (18,10-34,80) p <sub>1</sub> <0,001	39,80 (35,30-41,50) p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,05
CD80/86	46,85 (43,47-56,51)	27,30 (20,60-40,20) p <sub>1</sub> <0,05	27,04 (15,90-41,07) p <sub>1</sub> <0,05	22,56 (15,30-40,85) p <sub>1</sub> <0,05
TLR2	3,73 (3,70-3,95)	1,79 (0,30-2,67) p <sub>1</sub> <0,001	3,60 (2,50-4,72) p <sub>2</sub> <0,05	4,35 (4,28-4,51) p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>2</sub> <0,001; p <sub>3</sub> <0,05
HLA-DR	78,50 (64,70-80,95)	57,50 (38,30-62,10) p <sub>1</sub> <0,01	93,45 (84,15-98,15) p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,01	95,90 (90,50-98,90) p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,01

Обращал на себя внимание тот факт, что у пациентов с монорезистентным ТЛ, напротив, было зарегистрировано выраженное снижение числа TLR2-позитивных ДК относительно контрольных значений (Таблица 6).

При сравнительном анализе содержания HLA-DR-позитивных ДК было зарегистрировано его повышение у больных в группе с полирезистентным и МЛУ ТЛ – в среднем 1,2 раза относительно группы здоровых доноров. Однако у больных с монорезистентным ТЛ регистрировались противоположные (как и в случае с TLR2) изменения – снижение количества ДК с фенотипом HLA-DR<sup>+</sup> в 1,4 раза относительно аналогичных параметров в контрольной группе (Таблица 6).

### 3.3. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких

#### 3.3.1. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

При анализе цитокинпродуцирующей активности зрелых ДК в клеточной культуре было выявлено снижение (в среднем в 1,3 раза) концентрации IL-12 у пациентов с ИТЛ, и, напротив, повышение концентрации данного цитокина в группе больных с ДТЛ (в среднем в 2 раза) относительно соответствующих значений у здоровых доноров (Таблица 7).

Таблица 7

Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me (Q1-Q3)

Концентрация цитокинов, пг/мл	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Инфильтративный (n=36)	Диссеминированный (n=62)
IL-12	16,69 (14,67-20,87)	12,50 (8,67-13,70) p <sub>1</sub> <0,05	34,40 (25,85-44,90) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,001
IL-18	31,03 (30,25-34,04)	32,56 (16,51-34,54)	37,78 (35,90-44,90) p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>2</sub> <0,05

Кроме того, для пациентов с ДТЛ также было характерным увеличение концентрации IL-18 в супернатантах культуральных суспензий ДК относительно контрольных значений. Так, уровень цитокина у больных с ДТЛ оказался в среднем в 1,2 раза выше такового в группе здоровых доноров (Таблица 7).

### 3.3.2. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)

Согласно полученным данным, концентрация IL-12 в супернатантах культуральных суспензий ДК у больных с ЛЧТЛ и ЛУТЛ значительно превышала контрольные значения (в среднем в 1,6 раза и 1,4 раза соответственно) (Таблица 8).

Таблица 8

Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый),  
Me (Q1-Q3)

Концентрация цитокинов, пг/мл	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный (n=48)	Лекарственно-устойчивый (n=50)
IL-12	16,69 (14,67-20,87)	26,87 (22,52-39,78) p <sub>1</sub> <0,001	22,90 (18,12-38,84) p <sub>1</sub> <0,05
IL-18	31,03 (30,25-34,04)	41,12 (38,62-55,14) p <sub>1</sub> <0,001	32,56 (16,51-34,54) p <sub>2</sub> <0,05

Уровень IL-18 в супернатантах зрелых ДК также оказался выше нормы (в

1,3 раза) только у пациентов с ЛЧТЛ. Концентрация цитокина в супернатантах клеточных суспензий у больных с ЛУТЛ была сопоставимой с контрольными значениями (Таблица 8).

### 3.3.3. Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*

Сравнительный анализ полученных результатов продемонстрировал статистически значимое увеличение (по сравнению с контрольными значениями) концентрации IL-12 в супернатантах зрелых ДК как у больных с монорезистентным ТЛ (в среднем в 1,8 раза), так и у пациентов с МЛУ ТЛ (в среднем в 1,9 раза). При этом концентрация исследуемого цитокина у пациентов с полирезистентным ТЛ не отличалась от таковой в группе контроля (Таблица 9).

Таблица 9

Концентрация цитокинов в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, Me (Q1-Q3)

Концентрация цитокинов, пг/мл	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких		
		Монорезистентны й (n=23)	Полирезистентны й (n=12)	Множественно лекарственно-устойчивый (n=15)
IL-12	16,69 (14,67-20,87)	29,75 (16,66-40,20) $p_1 < 0,001$	17,70 (10,52-19,49) $p_2 < 0,001$	32,09 (8,60-36,64) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,01$
IL-18	31,03 (30,25-34,04)	27,72 (16,51-28,93) $p_1 < 0,05$	49,26 (31,03-54,54) $p_1 < 0,01; p_2 < 0,05$	24,27 (19,45-28,93) $p_1 < 0,05; p_3 < 0,05$

При анализе содержания в супернатантах культуральных суспензий ДК П-18 было выявлено повышение исследуемого показателя (в среднем в 1,6 раза) у больных с полирезистентным ТЛ по сравнению с соответствующими параметрами в группе здоровых доноров. При этом у пациентов с моно- и множественно-лекарственно-устойчивым ТЛ, напротив, регистрировалось низкое (по сравнению с контрольными значениями) содержание цитокина в исследуемых образцах (Таблица 9).

### **3.4. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких**

#### **3.4.1. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания**

Одним из фрагментов работы было измерение концентрации внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах ДК, полученных в результате трансформации из моноцитов периферической крови.

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий в концентрациях транскрипционного фактора NF-kB у здоровых доноров и больных ТЛ вне зависимости от клинической формы туберкулеза легких (Таблица 10).

#### **3.4.2. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый)**

При анализе концентрации NF-kB в клеточных лизатах дендритных клеток (%) у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый) не было выявлено

статистически значимых изменений исследуемого параметра по сравнению со значениями в группе контроля (Таблица 11).

Таблица 10

Содержание внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в клеточных лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me (Q1-Q3)

Исследуемый параметр	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Инфильтративный (n=36)	Диссеминированный (n=62)
Концентрация NF-kB, %	317,78 (98,89-355,56)	353,33 (232,02-382,22)	353,33 (298,88-383,33)

Таблица 11

Уровень внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в клеточных лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный/лекарственно-устойчивый) Me (Q1-Q3)

Исследуемый параметр	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный (n=48)	Лекарственно-устойчивый (n=50)
Концентрация NF-kB, %	317,78 (98,89-355,56)	352,22 (242,22-382,22)	352,22 (211,60-381,66)

### **3.4.3. Концентрация внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах дендритных клеток у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis***

Сравнение концентраций транскрипционного фактора NF-kB в клеточных лизатах ДК у больных с лекарственно-устойчивым ТЛ не выявило достоверных

их различий ни с группой здоровых доноров, ни межгрупповых различий у больных ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* (Таблица 12).

Таблица 12

Уровень внутриклеточного транскрипционного фактора NF-kB в клеточных лизатах дендритных клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, Ме (Q1-Q3)

Исследуемый параметр	Здоровые доноры (n=50)	Больные туберкулезом легких		
		Монорезистентный (n=23)	Полирезистентный (n=12)	Множественно лекарственно-устойчивый (n=15)
Концентрация NF-kB, %	317,78 (98,89-355,56)	297,77 (225,46-393,33)	352,22 (232,02-380,55)	357,77 (337,77-382,22)

Таким образом, в ходе выполненного исследования зарегистрировано, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы, варианта (ЛЧТЛ, ЛУТЛ) заболевания и спектра резистентности возбудителя к препаратам этиотропной терапии общее количество лейкоцитов, количество моноцитов (как относительное, так и абсолютное), трансформационная активность последних в ДК выше, чем у здоровых доноров. На фоне этого у больных ТЛ отмечается снижение числа TLR2-, CD86-позитивных и иммуногенных CD80/CD86 ДК по сравнению с контролем. При этом относительное содержание клеток с фенотипами HLA-DR<sup>+</sup> и CD80<sup>+</sup> в культуре трансформированных ДК у больных ТЛ превышает норму. Характер изменений цитокиновой секреции ДК зависит от клинической формы и варианта заболевания, при этом у больных ИТЛ выявляется гипосекреция IL-12, а при монорезистентном и МЛУ ТЛ – IL-18. Уровень ядерного транскрипционного фактора NF-kB в лизатах ДК у больных ТЛ не отличается от такового в контрольной группе.

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время общепризнанным является тот факт, что в основе манифестации туберкулезной инфекции лежит дисрегуляция иммунной системы [Маянский А.Н., 2001; Ерохин В.В., 2009; Уразова О.И., 2010; Сахно Л.В и соавт., 2012]. Эффективность антимикобактериального иммунитета определяется, прежде всего, состоятельностью клеточного звена адаптивного иммунитета. В результате большинства проведенных экспериментальных исследований установлено, что туберкулез сопровождается дефицитом Т-клеточного звена иммунитета, который характеризуется не только количественной, но и функциональной недостаточностью Т-лимфоцитов [Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009; Чурина Е.Г. и соавт., 2013]. В качестве патогенетических факторов данного иммунодефицита рассматриваются следующие: угнетение процессов пролиферации и апоптоз Т-лимфоцитов при активации регуляторных Т-клеток с иммуносупрессорной активностью, недостаточность Т-активирующих цитокинов, в частности IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , что в конечном итоге приводит к девиации иммунного ответа в сторону менее эффективного в отношении *Mycobacterium tuberculosis* гуморального иммунного ответа [Слабнов Ю.Д. и соавт., 2000; Воронкова О.В., и соавт., 2007; Шилько Т.А. и соавт., 2008; Новицкий В.В. и соавт., 2012; Хасанова Р.Р. и соавт., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2012; Zuniga J. et al., 2012]. Высказывается предположение, что данные изменения являются следствием более глубоких нарушений, развивающихся в иммунокомпетентных клетках на молекулярном уровне. Существует мнение, что дефицит Т-клеточного звена противoinфекционного иммунитета формируется в результате недостаточной активации Т-лимфоцитов антигенпрезентирующими клетками (АПК), в том числе дендритными клетками (ДК) [Уразова О.И., 2010; Сахно Л.В, Черных Е.Р., 2012; Saunders B.M., Britton W.J., 2007].

ДК являются клетками первой линии противомикробной защиты, их активационный сигнал в отношении Т-лимфоцитов во многом превышает таковой

от макрофагов [Хоченков Д.А., 2009]. Распространенность ДК в организме достаточно высока, а мощный рецепторный аппарат определяет их широкие функциональные возможности для взаимодействия с большим спектром патогенов и клеток-эффекторов [Пальцев М.А. и соавт., 2009; Хаитов Р.М., 2011]. Как известно, выбор направления дифференцировки Т-лимфоцитов осуществляется на раннем этапе иммунного ответа в ходе презентации им антигена АПК. Сигнал с поверхности ДК, передающийся на Т-клетку, и наработка соответствующих молекул активации (цитокинов) определяет последующую дифференцировку Т-лимфоцитов [Хоченков Д.А., 2008], которая напрямую зависит от степени зрелости ДК, их функциональной активности и цитокинового микроокружения. Инфектогены, в том числе *M. tuberculosis*, продукты их жизнедеятельности, метаболиты, продукты клеточного распада способны оказывать влияние на процессы созревания ДК из их предшественников – моноцитов, секреторную и антигенпрезентирующую функции тех и других [Есимова И.Е. и соавт., 2012; Шепелькова Г.С. и соавт., 2012; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2012]. Таким образом, структурные и функциональные нарушения ДК можно рассматривать как факторы иммунопатогенеза различных форм ТЛ.

В задачи настоящего исследования входило изучение рецепторного аппарата и цитокинсекреторной функции ДК в зависимости от клинко-патогенетического варианта туберкулеза легких (ТЛ) и спектра резистентности *M. tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии. Актуальность поставленных задач сводится к тому, что с недавнего времени в литературе обсуждается вопрос о влиянии биологических свойств возбудителя на процессы реализации иммунного ответа макроорганизма. Так, в исследованиях О.В. Воронковой [2006] и Р.Р. Хасановой [2008] продемонстрировано, что особенности реагирования иммунокомпетентных клеток крови при ТЛ, а также характер течения заболевания зависят от биологических свойств инфицирующего штамма микобактерий, что, в свою очередь, определяется его молекулярно-генетическими свойствами. Например, было показано, что у больных ТЛ, вызванным *M. tuberculosis* Beijing-семейства, степень лейкоцитоза, угнетение пролиферативной

активности лимфоцитов, гипопродукция IL-2 и гиперпродукция IL-12 носят более выраженный характер, чем при инфицировании «неBeijing»-штаммами возбудителя [Воронкова О.В., 2006; Хасанова Р.Р., 2008].

В более ранних работах показано, что для больных лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ) характерны нарушения большего спектра показателей иммунного статуса по сравнению с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ). Так, у больных с ЛУТЛ были зарегистрированы более низкие показатели ФГА-индуцированной пролиферации Т-клеток, в сыворотке крови отмечался более низкий уровень лактоферрина и активность миелопероксидазы в гранулоцитах относительно аналогичных параметров при ЛЧТЛ [Сахарова И.Я. и соавт., 2005].

На основании этого можно предположить, что нарушения на уровне ДК у больных с разным спектром лекарственной резистентности *M. tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии могут быть различными в силу неодинаковых механизмов поражения иммунокомпетентных клеток инфицирующим штаммом патогена.

В мировой практике лекарственную устойчивость разделяют на монорезистентность (наблюдается устойчивость к одному из противотуберкулезных препаратов основного ряда лечения), полирезистентность (устойчивость к двум и более препаратам основного ряда, но не к рифампицину и изониазиду одновременно), множественную (устойчивость одновременно к изониазиду, рифампицину и любому другому противотуберкулезному препарату). Данная классификация подразумевает специфические мутации в генах *M. tuberculosis*, обуславливающие их устойчивость к препаратам основного и резервного ряда [Филинчук О.В. и соавт., 2012].

Однако возбудитель – это основной, но не единственный этиологический фактор ТЛ. Предрасполагающим фактором к клинической манифестации туберкулезной инфекции, как уже указывалось выше, является иммунологическая недостаточность – генетически детерминированная или индуцированная (приобретенная). При этом следует учитывать, что ключевая роль в формировании неспецифических и специфических иммунных реакций организма

отводится системе крови, клетки которой выполняют иммунокомпетентные функции. Изменения параметров периферической крови при инфекционных заболеваниях являются интегральными показателями общего состояния организма, характеризуют степень выраженности общетоксического синдрома, состояние защитных реакций и реактивности организма в целом [Назаренко Г.И., Кишкун А.А., 2006; Луговская С.А., Козинец Г.И., 2009]. Поскольку данные изменения регистрируются уже на ранних этапах инфекционного процесса, исследование количественных показателей параметров периферической крови при инфекционной патологии не теряет своей актуальности.

В результате проведенных исследований было установлено, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (инфильтративный, диссеминированный) и варианта (лекарственно-чувствительный, лекарственно-устойчивый) заболевания, а также спектра лекарственной устойчивости инфицирующего штамма *M. tuberculosis* при ЛУТЛ общее количество лейкоцитов значительно превышало соответствующие показатели в контрольной группе (Таблицы 1, 2, 3). Как известно, лейкоцитоз в периферической крови является одним из проявлений воспалительного процесса в организме [Луговская С.А., Козинец Г.И., 2009]. Существует несколько механизмов развития лейкоцитоза при воспалении: высвобождение на периферию клеток костномозгового резерва, ускоренная их элиминация из костного мозга в сочетании с активацией лейкопоэза под действием гемопоэтических (в том числе провоспалительных) факторов. Важно отметить, что выраженность и характер (клеточный состав) инфекционного лейкоцитоза зависит от множества факторов, в том числе от свойств микроорганизма, состояния иммунной системы на момент инфицирования, характера тканевых изменений, активности процессов регенерации ткани, интенсивности потребления лейкоцитов в очаге воспаления, объема сосудистого и костномозгового резервов лейкоцитов и др. [Луговская С.А. и соавт., 2006; Рязанцева Н.В. и соавт., 2008].

Как уже было отмечено в обзоре литературы, специфическое воспаление при ТЛ характеризуется преобладанием реакций гиперчувствительности

замедленного типа и формированием гранулемы [Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009]. *M. tuberculosis*, попадающие в бронхоальвеолярный тракт, связываются с резидентными ДК или макрофагами. Проникая внутрь клетки, *M. tuberculosis* реализуют свой защитный потенциал, в частности, препятствуют слиянию фаго- и лизосом, изменяют рН внутренней среды фагосом, истощают ферментные системы АПК [Маянский А.Н., 2001; Каминская Г.О. и соавт., 2009]. Таким образом, с одной стороны, гранулема ограничивает поврежденный участок легочной ткани, а с другой – является местом размножения микобактерий, источником множества биологически активных веществ (цитокинов, ферментов, активных форм кислорода (АФК) и др.), а также токсинов и продуктов жизнедеятельности *M. tuberculosis*. Последние, действуя дистантно, могут негативным образом влиять на функциональную активность клеток крови, в том числе, иммунокомпетентных, особую роль среди которых играют моноциты, поскольку именно они являются предшественниками тканевых макрофагов и ДК. Время циркуляции моноцитов в периферической крови в среднем составляет не более 48 часов. Затем, взаимодействуя с адгезивными молекулами на поверхности эндотелиальных клеток, моноциты мигрируют в ткань [Титов В.Н., 2003; Макарова О.П. и соавт., 2003; Луговская С.А. и соавт., 2006; Луговская С.А., Козинец Г.И., 2009]. Известно, что в легкие попадает около 15% от общего пула мигрирующих моноцитов, где они трансформируются либо в макрофаги, либо в ДК. Важно отметить, что при воспалении активность процесса рекрутирования моноцитов из периферической крови в ткань, а также их последующее созревание зависят от специфического микроокружения очага воспаления [Луговская С.А., Козинец Г.А., 2009].

При изучении лейкоцитарного состава периферической крови у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы и варианта заболевания, при моно- и полирезистентном ТЛ было установлено увеличение количества моноцитов относительно параметров у здоровых доноров (Таблицы 1, 2, 3). Поскольку моноциты не формируют костномозговой резерв можно утверждать, что увеличение числа моноцитов в крови у обследованных больных ТЛ происходит за

счет усиления образования клеток и ускоренного выхода их из костного мозга на периферию.

Как уже было отмечено, структурно-функциональный статус мигрирующих из крови в ткань моноцитов определяет фенотипические и функциональные характеристики ДК. В работах многих авторов описаны нарушения функциональной активности моноцитов крови на фоне туберкулезной инфекции, что связывают, в первую очередь, как с токсическим воздействием *M. tuberculosis*, так и с действием клеточных медиаторов. В частности известно, что при туберкулезе формируется цитокиновый фон, характеризующийся преобладанием в крови цитокинов с иммуносупрессорным действием (IL-10 и TGF $\beta$ ) [Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2011; Чурина и соавт., 2012]. Последние способствуют угнетению функциональной активности фагоцитирующих клеток, а именно, снижению экспрессии на них С3b- и Fc $\gamma$ -рецепторов, истощению липидного и углеводного депо клеток, нарушению выработки оксида азота, TNF $\alpha$ , IL-12, и, в целом, угнетению кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных механизмов защиты. При этом исследователи указывают на тот факт, что данные изменения сопряжены с повышенной продукцией ряда провоспалительных цитокинов (IL-6, -8), и, напротив, с дефицитом цитокинов Th1-профиля (IL-1, -2) [Филинюк О. В. и соавт., 2005; Земляная Н.А. и соавт., 2006; Воронкова О.В. и соавт., 2007].

Известно также, что иммуносупрессорный IL-10 может нарушать процессы созревания рекрутированных моноцитов в тканях, т.е. их трансформацию в ДК [Redford P.S. et al., 2011; Vremec D. et al., 2011]. В работе Л.В. Сахно и Е.Р. Черных [2011] отмечено, что в периферической крови у больных ТЛ наблюдается повышение числа CD14/CD16-позитивных моноцитов с высоким внутриклеточным содержанием IL-10, т.е. обладающих иммуносупрессорной активностью [Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2011]. Как известно, именно из моноцитов с данным фенотипом при их рекрутировании в очаг воспаления образуются миелоидные ДК [Исайкина Я.И. и соавт., 2010]. Вероятно, при ТЛ функциональные нарушения, формирующиеся уже на уровне моноцитов, в

дальнейшем могут опосредовать нарушения процессов их трансформации в ДК и являться причиной изменений функциональной активности последних.

Процесс трансформации моноцитов в ДК *in vivo* достаточно сложен, требует соответствующего цитокинового микроокружения, дозы антигена (микроорганизма) и зависит от функционального потенциала самих моноцитов. В экспериментах было показано, что моноциты, полученные из периферической крови человека и мыши, приобретают свойства ДК только в присутствии *in vitro* гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и IL-4, что прямо указывает на миелоидное происхождение последних [Wu L., Dakic A., 2004; Liu K., Nussenzweig M.C., 2010].

Для выполнения задач исследования нами была выбрана одна из классических методик трансформации моноцитов в миелоидные ДК *in vitro* [Leon V. et al., 2005]. При стимуляции моноцитов с помощью GM-CSF и IL-4 в течение 2-3 дней в культуре начинают появляться первые незрелые ДК. Дальнейшее созревание ДК происходит при дополнительной стимуляции клеток бактериальным липополисахаридом (ЛПС). Ключевую роль в трансформации ДК из моноцитов периферической крови играет IL-4. Его использование предотвращает развитие из моноцитов макрофагов путем ингибирования экспрессии рецептора к ростовому фактору M-CSF (колониестимулирующий фактор моноцитов) и, напротив, увеличения экспрессии рецептора к GM-CSF на поверхности ДК [Steinman R.M., 2012].

Выбор ЛПС в качестве индуктора созревания ДК обоснован не только его доступностью, но и тем фактом, что рецептор TLR2 на поверхности ДК способен активироваться с помощью данного лиганда и запускать тот же внутриклеточный сигнальный путь, что и при индукции липоарабиноманнаном клеточной стенки *M. tuberculosis* [Тухватулин А.И. и соавт., 2010].

В ходе исследования иммунофенотипа и функциональной активности ДК, трансформированных из моноцитов периферической крови, было установлено, что количество в культуре ДК, экспрессирующих маркер CD209, у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы, варианта заболевания и спектра

устойчивости инфицирующего штамма *M. tuberculosis*, значительно превышало таковое у здоровых лиц (Таблицы 1, 2, 3). Молекула CD209 является маркером как зрелых, так и незрелых миелоидных ДК [Leon B. et al., 2005; Merad M., 2009]. Увеличение числа CD209-позитивных ДК *in vitro* у больных ТЛ свидетельствует об усилении трансформационной активности моноцитов периферической крови в ДК.

Как известно, сигнал к активации и последующему созреванию ДК передается через их распознающие рецепторы, в число которых входит как CD209 (DC-SING), так и CD282 (TLR2) [Tailleux L. et al., 2005; Srivastava V. et al., 2009]. В число патоген-ассоциированных структур, распознаваемых ДК, входят компоненты клеточной стенки *M. tuberculosis*, которые, соединяясь с рецептором на поверхности ДК, в частности с TLR2, способны индуцировать процессы внутриклеточной передачи активационного сигнала и, тем самым, влиять на последующие механизмы иммунного ответа [Апт А.С., Кондратьева Т.К., 2008]. Известно, что внешняя часть клеточной стенки *M. tuberculosis* представлена гидрофобными миколовыми кислотами, а внутренняя ее часть включает в себя арабиногалактан, пептидогликан и PIMs (phosphatidyl-myo-inositol mannosides). Следующий слой состоит из манозосодержащих биомолекул, таких как липоарабиноманнан, липоманнан и маногликопротеин [Briken V. et al, 2004]. Одни и те же структурные компоненты клеточной стенки *M. tuberculosis* могут взаимодействовать с различными рецепторами на поверхности ДК, но вызывать при этом прямо противоположные эффекты, что, в частности, показано и для рецепторов DC-SING и TLR2 [Шепелькова Г.С. и соавт., 2012].

В результате анализа особенностей иммунофенотипа ДК, трансформированных из моноцитов периферической крови, в настоящей работе было установлено снижение (относительно значений в группе контроля) числа TLR2-позитивных ДК у больных как инфильтративным, так и диссеминированным ТЛ (Таблица 4). В литературе встречаются данные о том, что при туберкулезной инфекции регистрируется снижение в периферической крови количества моноцитов, экспрессирующих TLR2, равно как и числа клеток,

несущих его акцессорную молекулу – CD14 [Druszczyńska M. et al., 2013]. Авторы предполагают, что это происходит в результате шеддинга рецепторов с поверхности моноцитов. Кроме того, обсуждается тот факт, что недостаточная наработка и презентация TLR2 на поверхности клеток опосредована молекулярно-генетическими механизмами, поскольку известно, что одним из факторов предрасположенности к туберкулезной инфекции является генетически обусловленный дефицит TLR2. Так, в моделях туберкулеза на мышах было показано, что при нокдауне гена *TLR2* наблюдается усиление «бактериального бремени», обширное повреждение тканей, возрастает частота летальных исходов [Yim J.J. et al., 2008].

Роль TLR2 в процессе сигнальной трансдукции в АПК велика; его недостаточная экспрессия на клетках при туберкулезной инфекции может являться одной из причин замедления и нарушения процессов последующей активации и созревания ДК, поскольку именно через сигнальную трансдукцию от рецепторов TLR-семейства обеспечивается активация и последующая экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС или (у человека) HLA), костимуляции (CD80, CD86), а также секреция регуляторных цитокинов (IL-12, IL-18) [Симбирцев А.С., 2005; Пальцев М.А. и соавт., 2009; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Тухватулин А.И. и соавт., 2010].

Сравнительный анализ количественного содержания в культуре ДК с фенотипом TLR2<sup>+</sup> в зависимости от варианта ТЛ показал, что у больных с ЛУТЛ, как и с ЛЧТЛ, отмечалось снижение числа клеток с исследуемым фенотипом по сравнению с нормой, но у пациентов с ЛУТЛ оно было выше, чем при ЛЧТЛ (Таблица 5).

Анализ содержания ДК, экспрессирующих TLR2, у больных ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной резистентности инфицирующего штамма *M. tuberculosis* выявил разнонаправленные изменения количества TLR2-позитивных ДК в клеточной культуре по сравнению с показателями у здоровых лиц. Так, у пациентов с монорезистентным ТЛ отмечалось снижение процентного содержания TLR2-позитивных ДК, при полирезистентном ТЛ оно было в

пределах нормы, а у больных с МЛУ ТЛ регистрировалось повышение количества клеток, экспрессирующих данный рецептор (Таблица 6). В данном случае можно предположить, что инфектоген (*M. tuberculosis*) определенным образом оказывает влияние на клетки организма хозяина, в частности, на моноцитарные клетки крови, изменяя «предуготовленность» последних к реализации своих функций непосредственно в очаге воспаления – фагоцитоз и презентацию антигена Т-лимфоцитам.

Как было отмечено выше, одним из важных рецепторов распознавания *M. tuberculosis* (помимо TLR2) является CD209 (DC-SING). Современные исследования подтверждают наличие перекрестных и взаимоингибирующих внутриклеточных сигнальных путей с рецептора TLR2 и DC-SING (CD209) в АПК. Установлено, что во внутриклеточном домене рецептора CD209 имеется супрессорный тирозин-содержащий компонент (ITAM), который способен ингибировать TLR2-опосредованный процесс созревания ДК [Мейл Д. и соавт., 2007; Кооук Y. et al., 2003; Antosz H. et al., 2013; Anwar M.A. et al., 2013]. При этом для изменения секреторной активности ДК наличие двойного сигнала с рецепторов DC-SING и TLR является необходимым условием. В процессе взаимодействия этих разных рецепторов на ДК со своим ключевым лигандом на поверхности *M. tuberculosis* – липоарабиноманнаном, формируются конкурирующие пути сигнальной трансдукции внутрь клетки, что в последующем изменяет направленность дифференцировки наивных Т-лимфоцитов. Так, например, сигнальная трансдукция в ДК, инициированная с рецептора DC-SING, приводит к секреции ими иммуносупрессорного IL-10 (что характерно для толерогенных клеток) и, в целом, к ингибированию процесса созревания ДК [Geurtsen J. et al, 2009; Valboa L. et al, 2010]. Напротив, взаимодействие лиганда с TLR2 опосредует процесс созревания, активации ДК и запуск специфического иммунного ответа, что характерно для иммуногенных ДК [Бережная Н.М., Сепиашвили Р.И., 2011; Brown J. et al., 2011]. Нельзя не отметить тот факт, что одним из механизмов «ускользания» *M. tuberculosis* из-под иммунного надзора является незаметное проникновение патогена внутрь АПК, минуя контакт с TLR,

в результате чего ДК не активируются, иммунный ответ не инициируется, формируются условия для персистенции патогена внутри клетки-хозяина [Чикилева И.О. и соавт., 2010]. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что у больных ТЛ сигнал к созреванию ДК, поступающий с рецепторов TLR2, является не только недостаточным в силу низкой экспрессии рецептора, но и (в случае полирезистентного и МЛУ ТЛ) может быть ингибирован конкурирующим сигналом с рецептора DC-SING.

Передача активационного сигнала с TLR2 в ядро клетки, обеспечивающая созревание ДК, может происходить по MyD88- и TRIF-зависимому путям сигнальной трансдукции [Brown J. et al., 2011]. Конечным результатом сигнальной трансдукции от рецептора распознавания является активация транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B, IRF3, IRF7 и группы факторов транскрипции AP-1 (транскрипционные факторы МАП-киназного пути) [Хаитов Р.М. и соавт., 2007; Oliveira-Nascimento L. et al., 2012]. Функция NF- $\kappa$ B заключается в усилении транскрипции в ядре ДК генов цитокинов (IL-12, IL-18, а также IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ), молекул костимуляции (CD80, CD86) и факторов адгезии.

При исследовании внутриклеточного содержания NF- $\kappa$ B в ДК, трансформированных из моноцитов периферической крови, у больных с различными клиническими формами лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого ТЛ не было обнаружено статистически значимых его изменений по сравнению с группой здоровых лиц (Таблицы 10, 11, 12). На фоне низкой экспрессии TLR2 это может свидетельствовать об активации наработки фактора через альтернативные пути сигнальной трансдукции. Очевидно, что у больных ТЛ внутриклеточный уровень NF- $\kappa$ B поддерживается в пределах нормы в силу высокой экспрессии рецептора CD209 [Gringhuis S.I. et al., 2007]. Однако, как указано выше, активация CD209-зависимой сигнальной трансдукции способствует формированию толерогенных ДК.

Активация Т-лимфоцитов осуществляется при непосредственном контакте с ДК через лиганд-рецепторные связи. При этом необходимым условием со стороны ДК является представление Т-клетке информации о микобактериальном

антигене в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA), а также «направляющий» и усиливающий дифференцировку Т-клеток сигнал с костимуляторных молекул. Только одновременная экспрессия молекул HLA и костимуляции на поверхности ДК способствует эффективной презентации антигена. Отсутствие или недостаточность того или иного сигнала может привести к формированию толерогенных ДК и, как следствие, к анергии Т-лимфоцитов [Мейл Д. и соавт., 2007; Ярилин А.А., 2010].

В результате проведенного исследования было зарегистрировано, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы и варианта заболевания количество HLA-DR<sup>+</sup> ДК превышает норму (Таблицы 4, 5). Исключение составили больные с монорезистентным ТЛ (Таблица 6).

Известно, что ДК способны презентировать *M. tuberculosis* Т-лимфоцитам только в комплексе с молекулами HLA класса II, к которым относятся, в частности, молекулы HLA-DR. Транскрипция генов молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-DR осуществляется конституционально. Образовавшиеся молекулы располагаются в везикулах цитоплазмы незрелых ДК и экспрессируются на поверхности клетки только после загрузки антигена на HLA и сигнала к созреванию [Мейл Д. и соавт., 2007; Чурина Е.Г., 2013]. По-видимому, высокая экспрессия молекул HLA-DR на поверхности ДК практически у всех больных ТЛ свидетельствует об отсутствии при ТЛ нарушений со стороны презентации антигена наивным Т-лимфоцитам.

Как следует из полученных в настоящем исследовании данных, высокая экспрессия HLA-DR на ДК у больных ТЛ сочеталась с повышенной экспрессией на клетках рецептора инициализации CD209, с которым связаны проникновение микобактериального антигена внутрь клетки, последующее образование фагосомы и фаголизосомы с расщеплением патогена на пептиды и встраивание последних в HLA класса II [Мейл Д. и соавт., 2007]. Анализ корреляций между данными параметрами – количеством HLA-DR<sup>+</sup> и CD209<sup>+</sup> ДК у больных ТЛ – показал наличие прямой и средней по силе связи ( $r=0,55$ ;  $p<0,05$ ).

Вместе с этим, следует учитывать, что загрузка антигена может

происходить только в условиях формирования эффективного сигнала при связывании ДК с патогеном и его последующем процессинге (расщеплении). В силу же низкой экспрессии антиген-связывающего рецептора TLR2 данные процессы могут быть нарушены. Проведенные ранее исследования [Маянский А.Н., 2001; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2011; Есимова И.Е. и соавт., 2012] показали, что процессинг микобактериального антигена нарушается при предотвращении слияния фагосомы и лизосомы, защелачивании среды фаголизосомы, при наличии у *M. tuberculosis* толстой и высокогидрофобной клеточной оболочки. В частности, эффективному расщеплению микобактерий на пептиды препятствует липоарабиноманнан. Выше названные механизмы препятствуют нормальной загрузке антигена на HLA и формированию HLA-пептидного комплекса.

Сравнительный анализ количества HLA-DR-позитивных ДК в группах больных ЛУТЛ в зависимости от спектра лекарственной устойчивости инфицирующего штамма возбудителя показал его снижение сравнительно с контролем только в группе больных с монорезистентным ТЛ (Таблица 6). Возможной причиной этому может быть пониженный уровень экспрессии TLR2 на ДК у данной группы больных ЛУТЛ, в то время как при полирезистентном и МЛУ ТЛ он был выше нормы (Таблицы 4, 5, 6). Ясно, что низкая экспрессия HLA-DR на ДК у больных монорезистентным ТЛ не способна обеспечить достаточного по времени антиген-специфического распознавания, что, в конечном итоге, может привести к распаду иммунного синапса и нарушению прайминга контактирующего с АПК Т-лимфоцита. Таким образом, зарегистрированное снижение числа HLA-DR-позитивных ДК у больных с монорезистентным ТЛ усугубляет патогенез дисфункции этих клеток, проявляющейся не только на этапе связывания, но и (в отличие от ТЛ с более широким спектром лекарственной резистентности возбудителя) презентации антигена.

Костимуляторный сигнал является вторым необходимым условием для активации Т-лимфоцитов при формировании иммунного синапса с АПК [Medvedev A.E. et al., 2006]. Костимуляторные молекулы начинают

экспрессироваться на поверхности ДК по мере их созревания. Корцепторы CD80 и CD86 принадлежат к семейству молекул В7 (В7-1 и В7-2 соответственно) и являются лигандами для молекул семейства CD28 и СТLА-4, которые экспрессируются на поверхности как наивных, так и активированных Т-лимфоцитов [Хоченков Д.А., 2009; Ярилин А.А., 2010].

В результате настоящего исследования было установлено, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической его формы, как при лекарственно-чувствительном, так и при лекарственно-устойчивом варианте заболевания, в клеточных культурах регистрировалось пониженное (относительно контрольных значений) содержание ДК, несущих на своей поверхности молекулу CD86 (Таблицы 4, 5, 6). Сходные результаты были получены Л.В. Сахно и соавт. [2012], при этом авторы указали на тот факт, что недостаточная экспрессия корцептора CD86 регистрируется еще на стадии моноцитарной клетки и сохраняется таковой на поверхности трансформированных ДК [Сахно Л.В. и соавт., 2012].

Особенностью костимуляторных молекул является их индуцибельная экспрессия. При взаимодействии микробных продуктов с TLR на поверхности ДК транскрипция генов молекул костимуляции резко увеличивается в результате активации таких транскрипционных факторов, как NF-kB, IRF7, AP-1 и открытого недавно – PU.1 [Balboa L. et al., 2010; Kanada S. et al., 2010]. Возможно, что, несмотря на нормальную активность фактора NF-kB в ДК, «мощности» сигнального каскада от рецептора TLR2 (в виду его дефицита на ДК у больных ЛЧТЛ и большей части больных ЛУТЛ) недостаточно для активации транскрипции гена, кодирующего молекулу CD86. Корреляционный анализ показателей NF-kB и CD86 не зарегистрировал какой-либо статистически значимой зависимости между данными показателями у больных ТЛ, при этом коэффициент корреляции составил  $r=-0,093$  ( $p>0,05$ ).

Снижение экспрессии на поверхности ДК молекулы CD86, и, как следствие, нарушение формирования адекватного иммунного синапса между АПК и Т-лимфоцитами может являться одним из патогенетических факторов

функциональной недостаточности последних. Так, ранее проведенные нами исследования показали, что пролиферативная активность лимфоцитов крови на фоне туберкулезной инфекции, как спонтанная, так и стимулированная (митогенами, антигенами, рекомбинантными цитокинами), значительно понижена; отмечается дефицит общего числа и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов при активации апоптоза CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов-хелперов (вследствие структурной дезорганизации их мембраны, хромосомных aberrаций и др.), что негативным образом сказывается на эффективности противотуберкулезного иммунного ответа [Новицкий В.В. и соавт., 2006; Воронкова О.В. и соавт., 2008; Шилько Т.А. и соавт., 2008; Хасанова Р.Р. и соавт., 2010]. Кроме того, показано, что в отсутствие либо при недостаточной силе сигнала, поступающего с корцептора, происходит переход наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состояние анергии, либо их трансформация в Treg, способные индуцировать иммунологическую толерантность [Lin C.H., Hunig T., 2004; Чурина Е.Г. и соавт., 2013; Tian M. et al., 2013].

Известно, что при формировании иммунологического синапса активационный сигнал с рецепторного комплекса «CD86 – CD28» передается внутрь Т-лимфоцита, инициирует в его ядре экспрессию иммунорегуляторных генов и последующую наработку кодируемых ими цитокинов, в частности IL-1, -2, -4, -5, -12, IFN $\gamma$  [Sansom D.M. et al., 2003]. При этом молекула CD28 на Т-клетках способна взаимодействовать на поверхности ДК не только с костимуляторной молекулой CD86, но и с молекулой CD80. Однако установлено, что сродство CD28 к костимуляторной молекуле CD86 во много раз превышает таковое к CD80. Молекула CD80 участвует в передаче сигнала внутрь Т-лимфоцита и также является ключевой костимуляторной молекулой, опосредующей активацию Т-клеток, их пролиферацию и дифференцировку [Sansom D.M. et al., 2003; Pentcheva-Hoang T. et al., 2004; Zheng Y. et al., 2004; Gerdes N., Zirlik A., 2011; Хоченков Д.М., Гаврилова М.В., 2012; Merrill J.T., 2013].

Как показали результаты проведенного исследования, у больных ТЛ

регистрировалось увеличение (по сравнению с контролем) количества ДК, экспрессирующих на своей поверхности молекулу CD80, исключение составила группа больных с монорезистентным ТЛ (Таблицы 3, 4, 5).

Исследования иммунного синапса и открытие гомолога CD28 – молекулы CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) (CD152) показали участие CD80 не только в процессах активации, но и в механизмах супрессии Т-лимфоцитов и последующей активации их апоптотической программы [Sansom D.M. et al., 2003; Saito T., Yokosuka T., 2006; Gu P. et al., 2012]. Так, установлено, что формирование иммунного синапса «ДК – Т-лимфоцит» через контакт молекул CD80 и CTLA-4 приводит к наработке в ДК фермента 2,3-диоксигеназы, который способен разрушать аминокислоту триптофан. Разрушение триптофана стимулирует апоптоз новообразованных Т-клеток [Хоченков Д.А., 2008]. Важно заметить, что сигнальная трансдукция, индуцированная контактом «CD86 – CD28», препятствует метаболизму триптофана в ДК [Pentcheva-Noang T. et al., 2004; Tseng S.Y. et al., 2005; Wing K. et al., 2011; Merrill J.T., 2013].

Согласно исследованиям зарубежных ученых, одним из последствий взаимодействия молекул CD80 и CTLA-4 является формирование Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) и периферической толерантности [Sallusto F., Lanzavecchia A., 2002]. Иммунная периферическая толерантность также может развиваться при комплексировании молекул CD80 с иммуносупрессорной молекулой B7-H1 (CD274, PD-L1), постоянно экспрессирующейся на поверхности Т-лимфоцитов [Keir M.E. et al., 2008; Gu P. et al., 2012].

Известно также, что молекула CD86 ответственна за костимуляцию на раннем этапе презентации антигена, в отличие от CD80, наличие которой требуется в более поздние периоды Т-клеточного прайминга [Ярилин А.А., 2010]. Повышение экспрессии молекул CD80 на поверхности ДК в условиях дефицита молекул CD86 не может компенсировать последний. Более того, активационный сигнал с ДК в этом случае является неэффективным в силу отсутствия первичной костимуляции [Greaves P., Gribben J.G., 2012; Chen L., Flies D.B., 2013].

Основным транскрипционным фактором, ответственным за экспрессию

молекул костимуляции, в частности CD80, является NF- $\kappa$ B [Ярилин А.А., 2010]. Возможно, что, несмотря на конкурирующую сигнальную трансдукцию с рецепторов CD209 и TLR2, ген, кодирующий молекулу CD80 транскрибируется и молекула костимуляции «выставляется» на поверхности ДК. При этом корреляционный анализ выявил наличие прямой слабой зависимости между данными показателями ( $r=0,28$ ,  $p<0,05$ ).

Важно заметить, что обе молекулы – CD80 и CD86 на поверхности ДК могут опосредовать как активацию Т-лимфоцитов, так и оказывать ингибирующие эффекты на Т-клетки в зависимости от того, с каким лигандом на поверхности лимфоцита произойдет их комплексирование: с активационной молекулой CD28 или супрессорной молекулой CTLA-4 [Bakdash G. et al., 2013; Hubo M. et al., 2013] (Рисунок 5).

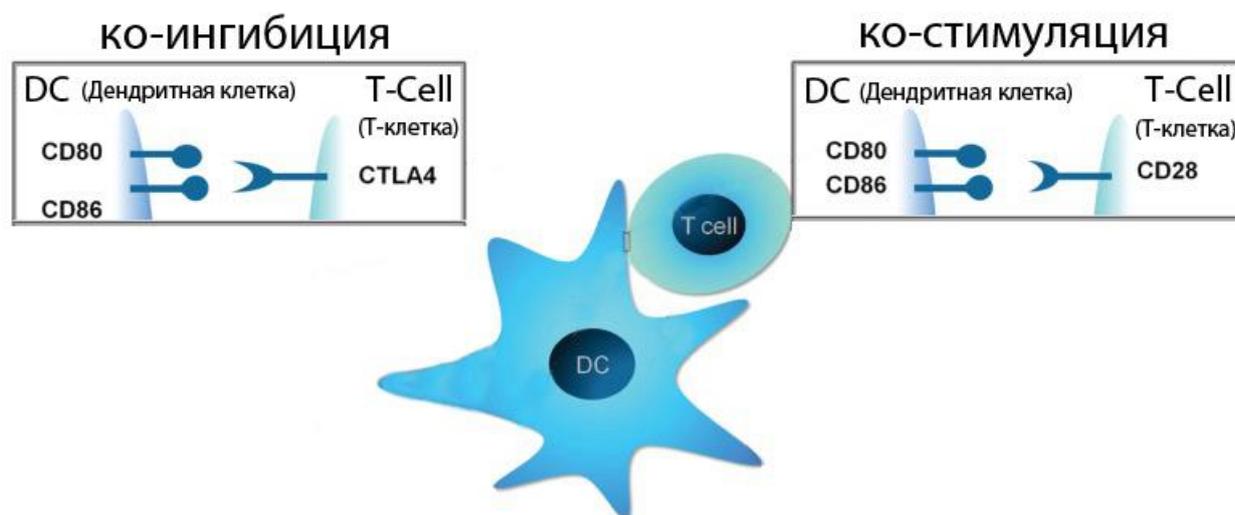


Рисунок 5. Костимуляторные и коингибиторные молекулы в процессе формирования иммунологического синапса (по данным G. Bakdash et al., 2013).

В ходе недавно проведенных исследований в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России установлено, что количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих на мембране молекулу CD28, у больных инфильтративным и диссеминированным ТЛ

существенно ниже, чем у группе здоровых лиц. При этом, количество CTLA-4-позитивных Т-клеток у больных ТЛ, напротив, превышает норму [Есимова И.Е. и соавт., 2012; Кошкина А.С., 2012].

Таким образом, недостаточная экспрессия на поверхности ДК корцепторных молекул, опосредующих формирование полноценного сигнала для Т-клеточной активации, может являться одним из патогенетических факторов функциональной недостаточности Т-лимфоцитов и клеточно-опосредованного иммунного ответа в целом даже в случае достаточной антигенспецифической стимуляции ДК.

Известно, что для формирования «зрелого» (или состоятельного) иммунного синапса, как структурированной зоны контакта между ДК и Т-лимфоцитом, необходима экспрессия обеих костимуляторных молекул на поверхности ДК – CD80 и CD86. В ходе настоящего исследования было установлено, что у больных ТЛ вне зависимости от клинической формы (ИТЛ или ДТЛ) и варианта (ЛЧТЛ или ЛУТЛ) заболевания количество ДК с фенотипом CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> снижалось по сравнению с соответствующими значениями у здоровых лиц (Таблицы 4, 5, 6).

На сегодняшний момент CD80/CD86-позитивные ДК считаются иммуногенными, их основная функция – это адекватная передача Т-лимфоцитам необходимой информации. При этом данный момент является ключевым в индуктивной фазе противотуберкулезного иммунитета и определяет дальнейшую активацию и дифференцировку Т-лимфоцитов.

Таким образом, снижение количества иммуногенных CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ДК у больных ТЛ способствует нарушению процессов костимуляции и, кроме того, презентации антигена наивным Т-лимфоцитам, опосредует переключение их в состояние Т-клеточной анергии [Чурина Е.Г., 2013]. Очевидно, что недостаточное количество иммуногенных ДК является одним из основных патогенетических факторов нарушения противотуберкулезного иммунного ответа.

Костимуляторный сигнал является не единственным условием для активации Т-лимфоцитов и их последующей дифференцировки в Т-лимфоциты-

хелперы типа 1 (Th1). Основную «направляющую» функцию осуществляют иммунорегуляторные цитокины, которые, в частности, секретируются ДК при их антиген-опосредованной активации [Хаитов Р.М., 2011; Xu M. et al., 2010].

Цитокиновое микроокружение клеток, участвующих в иммунном ответе, является необходимым условием для межклеточной кооперации. Цитокины обеспечивают передачу сигнала, обмен информацией между клетками. Секреция цитокинов ДК определяет активационные сигналы не только в направлении клеток-эффекторов, но и обратно – в АПК. Так реализуется один из основных принципов функционирования цитокиновой сети – принцип ауто- и паракринной регуляции [Симбирцев А.С., 2005; Хаитов Р.М., 2011].

Процесс каскадной передачи активационного сигнала от TLR2 на поверхности АПК завершается инициацией транскрипции генов не только костимуляторных молекул, но и регуляторных цитокинов и их рецепторов. Для оценки цитокин-секреторной активности ДК, трансформированных из моноцитов периферической крови, в настоящей работе у больных ТЛ было проведено определение концентрации IL-12 (его биологически активного гетеродимера – IL-12p70) и IL-18 в супернатантах клеточных суспензий ДК после индукции клеток антигеном (бактериальным ЛПС).

Известно, что IL-12 нарабатывается уже на начальных этапах активации ДК и является цитокином с плеiotропным типом действия, активируя как сами АПК, так и наивные Т-лимфоциты. IL-12 направляет дифференцировку Т-лимфоцитов в Th1, способствует наработке последними IFN $\gamma$  [Кетлинский С.А., 2005]. Кроме того, IL-12 способствует поддержанию пула Th1-лимфоцитов путем индукции секреции ими ростового фактора IL-2 и подавления функциональной активности Т-лимфоцитов-хелперов 2 типа (Th2) [Фрейдлин И.С., 1999; Olleros M.L. et al., 2007; Cooper A.M., Khader S.A., 2008]. IL-12 по своей структуре является гликопротеином и состоит из двух субъединиц – p40 и p35. Биологической активностью обладает гетеродимер (IL-12p70), в котором субъединица p40 необходима для связывания с комплементарным рецептором на поверхности Т-лимфоцитов, а субъединица p35 отвечает за трансдукцию сигнала внутрь клетки.

Известно, что гомодимеры p40 способны блокировать рецепторы к IL-12 и, тем самым, препятствовать активации Th1-клеток [Кетлинский С.А., 2005; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Нами было зарегистрировано, что у пациентов с инфильтративной формой ТЛ уровень секреции IL-12 оказался ниже, а у больных с ДТЛ, напротив, выше соответствующих параметров у здоровых доноров (Таблица 7).

Исследования последних лет, касающиеся иммунопатогенеза отдельных клинических форм ТЛ, свидетельствуют о том, что для ИТЛ характерно наиболее выраженное угнетение клеточно-опосредованных иммунных реакций по сравнению с диссеминированным ТЛ [Воронкова О.В. и соавт., 2010], что, по-видимому, и является следствием недостаточной продукции при ИТЛ одного из основных Th1-ассоциированных цитокинов – IL-12.

Причиной разнонаправленной секреции ДК IL-12 у больных ИТЛ и ДТЛ могут быть нарушения в сигнальной трансдукции от поверхностных рецепторов – TLR2 и CD209, что объясняется «победой» того или иного конкурентного пути. Так, известно, что в основе ингибирования TLR2-зависимой секреции цитокина лежит активация внутриклеточного белка SOCS1 с рецептора CD209 [Srivastava V. et al., 2009].

Известно также, что ген данного цитокина является мишенью транскрипционного фактора p38 (помимо NF- $\kappa$ B), сигнал к которому передается через адаптерную молекулу MyD88 [Хаитов Р.М. и соавт., 2007, 2009]. Возможно, при различных клинических вариантах ТЛ активируются разные ветви MyD88-зависимого сигнального пути от TLR2. Также известно, что MyD88 может активироваться и запускать аналогичный TLR2-каскад реакций через рецептор к IL-18 – IL-18R [Ярилин А.А., 2010].

Повышенный уровень стимулированной продукции IL-12 у пациентов с диссеминированной формой ТЛ, вне зависимости от варианта ТЛ (при ЛЧТЛ и ЛУТЛ), а также у больных с монорезистентным и МЛУ ТЛ (Таблицы 7, 8, 9), безусловно, свидетельствует о высокой цитокин-секреторной реактивности ДК. Однако, как стало известно не так давно, IL-12 способен оказывать влияние на

процессы пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов только в синергизме с молекулами костимуляции (в частности, с CD86) [Cooper M.A., 2009]. Поскольку в результате проведенных исследований у всех больных ТЛ была выявлена недостаточность CD86-экспрессирующей функции ДК, а также снижение числа клеток с фенотипом CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>, можно предположить, что эффекты цитокина в отношении Т-клеток окажутся нереализованными, даже в случае его избыточной продукции.

В ходе исследования способности ДК секретировать IL-18 были получены результаты, в некоторой степени сходные с таковыми в отношении гиперсекреции IL-12: увеличение секреции IL-18 (по сравнению с соответствующими параметрами в группе здоровых доноров) отмечалось у больных с ДТЛ, ЛЧТЛ и при полирезистентном варианте ТЛ, тогда как при ИТЛ и в общей группе больных с ЛУТЛ концентрация цитокина в супернатантах культуральных суспензий ДК оказалась сравнимой с нормой, а при монорезистентном и МЛУ ТЛ – ниже нее (Таблицы 7, 8, 9).

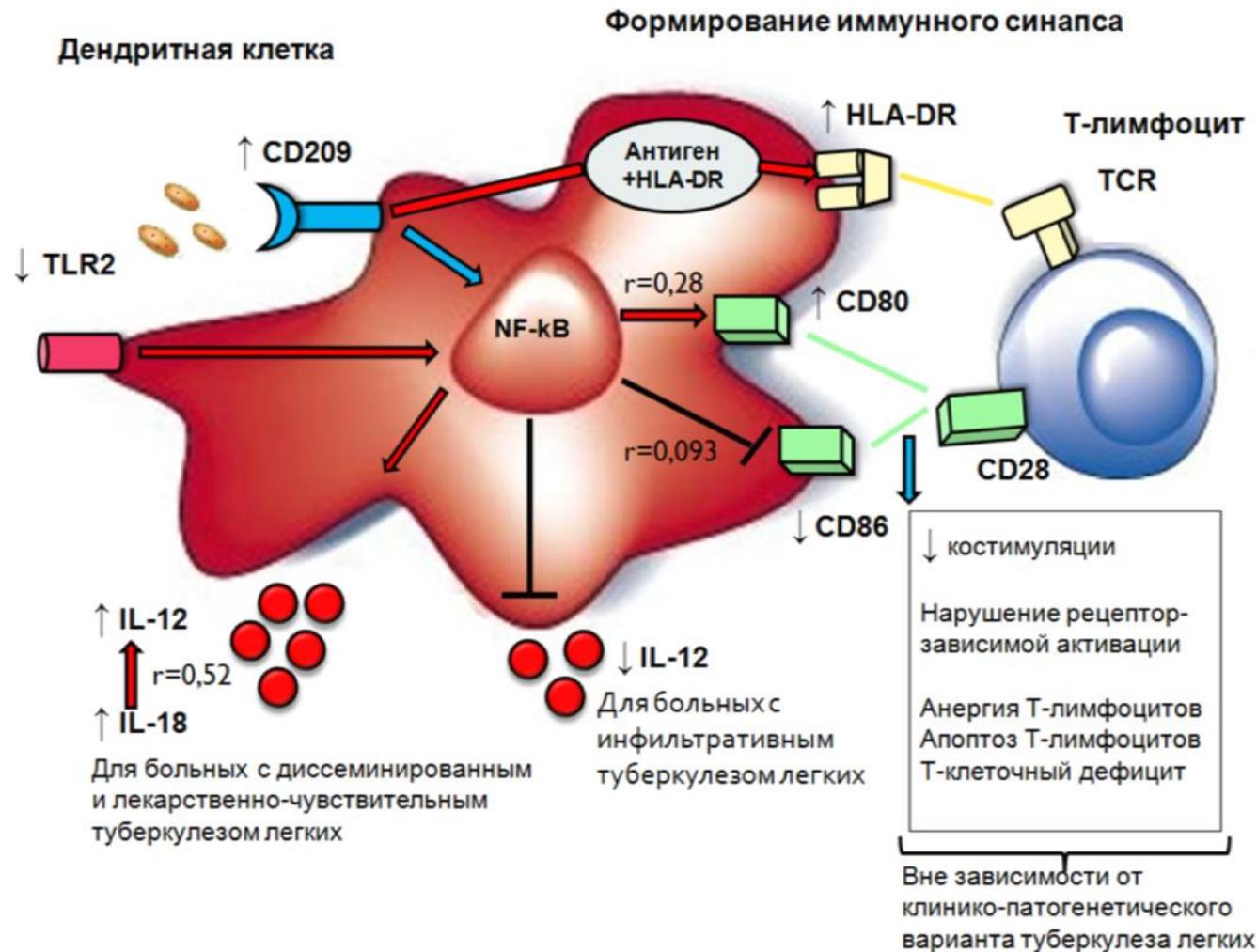
Известно, что IL-18 выполняет синергичные с IL-12 функции, стимулирует экспрессию  $\beta_2$ -субъединицы IL-12R на Т-клетках [Мейл Д. и соавт., 2007]. Так, активная форма IL-18 обладает плеiotропным эффектом в отношении иммунокомпетентных клеток и активирует секрецию как про-, так и противовоспалительных цитокинов. При этом IL-18 только в комбинации с IL-12 способен стимулировать секрецию IFN $\gamma$  в Т-лимфоцитах, тогда как на НК-клетки он может действовать самостоятельно, т.е. без участия IL-12 [Vankayalapati R. et al., 2000; Lee J.-S. et al., 2002].

Надо заметить, что в отношении диссеминированной формы ТЛ было показано одновременное повышение секреции ДК обоих цитокинов – как IL-18, так и IL-12 (Таблица 7). Возможно, механизм этого следующий: IL-18 аутокринно стимулирует ДК через рецептор IL-18R, который содержит TIR-домен и запускает MyD88-зависимый сигнальный путь без участия TLR2-рецептора, усиливая транскрипцию генов данного сигнального пути, в число которых входит ген *IL12*

[Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Ярилин А.А., 2010]. Корреляционный анализ зарегистрировал прямую зависимость средней силы между показателями секреции IL-12 и IL-18 у больных ДТЛ ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ).

По-видимому, аналогичный механизм лежит в основе гиперпродукции обоих цитокинов ДК при ТЛ с лекарственной чувствительностью *M. tuberculosis* (Таблица 8), что связано с биологическими свойствами возбудителя. Корреляционный анализ также выявил прямую зависимость средней силы между параметрами секреции IL-12 и IL-18 у больных ЛЧТЛ ( $r=0,54$ ;  $p<0,05$ ), аналогичную таковой при ДТЛ.

Резюмируя полученные данные, можно выделить ряд патогенетических факторов, которые лежат в основе дисфункции ДК и иммунопатогенеза туберкулеза (Рисунок 6). Так, при ТЛ трансформация моноцитов в ДК *in vitro* в условиях их индукции происходит активнее, чем у здоровых доноров. Однако такого рода активное созревание моноцитов крови в ДК сочетается с признаками изменений функционального статуса трансформированных клеток. Показано, что у больных ТЛ сигнал активации ДК не может быть достаточно эффективным в силу дефицита поверхностных рецепторов для связывания антигена TLR2 и повышенной экспрессии молекул CD209, конкурирующих с TLR2. При этом в силу повышенной экспрессии на ДК молекул главного комплекса гистосовместимости класса II – HLA-DR, способность ДК презентировать антиген, не страдает (за исключением больных с монорезистентным ТЛ). С другой стороны, показано, что у больных ТЛ уровень транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в ДК не изменяется, но, несмотря на это, снижается экспрессия молекул костимуляции CD86 и количество иммуногенных CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ДК. Таким образом, страдает ранний этап презентации антигена ввиду нарушения костимуляции и отсутствия условий, необходимых для формирования иммунного синапса между ДК и Т-лимфоцитом и активации Т-клеток. Данная ситуация усугубляется гипосекрецией ДК одного из ключевых цитокинов активации Т-клеток – IL-12 (при ИТЛ), а также IL-18 (при монорезистентном и МЛУ ТЛ), стимулирующего экспрессию на Т-клетках рецептора к IL-12 (IL-12R $\beta_2$ ).



Примечание: TLR2 - толл-подобный рецептор типа 2 для связывания антигена на поверхности дендритной клетки; CD209 - рецептор инициализации дендритных клеток (маркер дендритных клеток миелоидного происхождения); NF-kB - ядерный фактор транскрипции; HLA-DR - молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II на поверхности дендритной клетки; CD80/CD86 - молекулы коstimуляции на поверхности дендритной клетки; TCR - Т-клеточный рецептор для распознавания антигена; CD28 - молекула коstimуляции на поверхности Т-лимфоцита. Красный цвет стрелки - активация, синий - угнетение.

Рисунок 6. Патогенетические факторы дисфункции дендритных клеток у больных туберкулезом легких на основании результатов собственных исследований и (в рамке) данных литературы.

Полученные результаты подчеркивают актуальность дальнейшего, более детального изучения молекулярных механизмов дисрегуляции противотуберкулезного иммунного ответа на разных этапах его реализации, с целью выявления критериев диагностики его нарушений, а также для разработки методов патогенетически обоснованной коррекции установленных нарушений с учетом клинико-патогенетического варианта туберкулезной инфекции.

## ВЫВОДЫ

1. У больных туберкулезом легких увеличение относительного и абсолютного количества моноцитов в крови сочетается с повышением их трансформационной активности в дендритные клетки в условиях *in vitro* с максимальной ее выраженностью при множественно лекарственно-устойчивом варианте болезни.

2. Дефицит на дендритных клетках рецепторов для связывания антигена типа TLR2, конкурирующих за адаптерные молекулы с рецепторами CD209, не влияет на содержание активной формы внутриклеточного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B у больных туберкулезом легких.

3. Дисбаланс рецепторов на дендритных клетках, формирующих иммунный синапс с Т-лимфоцитами, у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких вне зависимости от клинической формы заболевания проявляется гиперэкспрессией молекул HLA-DR и CD80 на фоне дефицита молекул CD86 и числа иммуногенных клеток с иммунофенотипом CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>.

4. Секреция цитокинов дендритными клетками *in vitro* у больных туберкулезом легких различается в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания. Нормальный уровень продукции IL-18 дендритными клетками сочетается с гипосекрецией IL-12 при инфильтративном туберкулезе легких и с гиперсекрецией IL-12 при лекарственно-резистентном туберкулезе легких; при диссеминированном и лекарственно-чувствительном туберкулезе легких определяется гиперсекреция обоих цитокинов.

5. При монорезистентном туберкулезе легких признаки дисфункции дендритных клеток являются более выраженными, чем при поли- и множественно-резистентном его вариантах – повышение секреции IL-12 *in vitro* сочетается с дефицитом секреции IL-18 и гипоэкспрессией на клетках рецепторов, необходимых для активации Т-лимфоцитов – молекул для связывания антигена (TLR2), его презентации (HLA-DR) и костимуляции (CD86).

6. При полирезистентном туберкулезе легких дефицит на дендритных клетках молекул CD86 для костимуляции Т-лимфоцитов на ранних этапах презентации антигена сочетается с гиперэкспрессией гомологичных им молекул костимуляции CD80, а также HLA-DR в комплексе с повышением секреции IL-18.

7. При множественно лекарственно-резистентном туберкулезе легких гипосекреция IL-18 дендритными клетками и нарушение их костимулирующей функции вследствие дефицита молекул CD86 сочетаются с повышением продукции IL-12 и экспрессии молекул для связывания и презентации антигена (TLR2, HLA-DR).

### Список литературы

1. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения / Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, А.А. Буркова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 1, № 3. – С. 56–62.
2. Активность фагоцитирующих клеток периферической крови у больных туберкулезом легких до и в процессе противотуберкулезной терапии / Н.А. Земляная, О.В. Филинук, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 2-3. – С. 266
3. Ассоциирование уменьшения количества Т-клеток 1-го типа в периферической крови больных туберкулезом легких со снижением экспрессии костимуляторных CD80-молекул на моноцитах / О.В. Темчура, В.В. Сенюков, Н.В. Пронкина и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 2. – С. 25–28.
4. Апоптоз, микро- макроэлементный состав лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / Т.А. Шилько, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 8. – С. 24–26.
5. Апт, С.А. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина. / С.А. Апт, Т.К. Кондратьева // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 5. – С. 880–890.
6. Ахматова, Н.К. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоифекционный / Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский — М.: Практическая медицина, 2008. — 256 с.
7. Бабешко, В.Г. Иммуноterapia с применением дендритных клеток – новый тренд в лечении пациентов с миеломной болезнью / В.Г. Бабешко, Д.А. Базека, А.А. Чумак // Украинский медицинский журнал. – 2002. – № 4. – С. 9–16.
8. Бехало, В.А. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления / В.А. Бехало, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Иммунология. – 2009. – № 3. – С. 184–188.

9. Бережная, Н.М. Toll-подобные рецепторы как физиологические регуляторы врожденного и приобретенного иммунитета / Н.М. Бережная, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 187–189.
10. Бондаренко, В.М. Взаимодействие кишечной микрофлоры с TOLL-подобными рецепторами в норме и при патологии / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Иммунология. – 2009. – № 5. – С. 317–321.
11. Ганковская, О.А. Взаимодействие вирусов и Toll-подобных рецепторов / О.А. Ганковская, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 2. – С. 101–105.
12. Генерирование дендритных клеток *in vitro* из моноцитов и CD34+ гемопоэтических предшественников продукта лейкофереза пациентов со злокачественными новообразованиями / Я.И. Исайкина, О.В. Клименкова, И.А. Семак и др. // Онкологический журнал. – 2010. – Т. 4, № 4(16). – С. 40–46.
13. Гриневич, Ю.А. Вакцины на основе антигенпрезентирующих дендритных клеток в иммунотерапии больных со злокачественными опухолями / Ю.А. Гриневич, Н.Н. Храновская // Онкология. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 365–370.
14. Двойственная роль толлподобных рецепторов в регуляции противоопухолевого иммунитета / И.О. Чикилева, А.В. Караулов, Н.Ю. Анисимова и др. // Иммунология. – 2010. – № 1. – С. 52–55.
15. Дефект антигенпредставляющих клеток у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, Ж.М. Распай, М.А. Тихонова и др. // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 245–254.
16. Дисфункция макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, С.Д. Никонов и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 2. – С. 101–108.
17. Еремеев, В.В. Взаимодействие макрофаг-микобактерия в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию / В.В. Еремеев, К.Б. Майоров // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 3. – С. 54–57.
18. Ерохин, В.В. О некоторых механизмах патогенеза туберкулеза / В.В. Ерохин // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – Т. 86, № 11. – С. 3–8.

- 19.Ивашкин, В.Т., Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В.Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2008. – № 4. – С. 4–14.
- 20.Иммуносупрессорные эффекты Т-регуляторных клеток при инфильтративном туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 4. – С. 26–29.
- 21.Иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-лимфоцитов крови при диссеминированном туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 143–146.
- 22.Иммунология и аллергология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / под. ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. – М.: Практическая медицина, 2006. – 288 с.
- 23.Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе / Е.В. Якушенко, Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 355–364.
- 24.Использование дендритных клеток и интерлейкина-18 для модуляции иммунного ответа против НВсAg *in vitro* // О.П. Хрипко, Е.В. Якушенко, С.В. Сенников и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 5. – С. 109–113.
- 25.Кетлинский, С.А. Роль гетеродимерных цитокинов семейства IL-12 в развитии и регуляции врожденного иммунитета и TH1 иммунного ответа / С.А. Кетлинский // Медицинский академический журнал. – 2005. – Т. 5, № 3. – С. 13–27.
- 26.Козлов, В.А. Механизмы потери иммунологической толерантности к собственным антигенам щитовидной железы при хроническом аутоиммунном тиреоидите: роль регуляторных Т-клеток / В.А. Козлов // Иммунология. – 2005. – № 5. – С. 255–260.
- 27.Козлов, В.А., Современные проблемы иммунотерапии в онкологии / В.А. Козлов, Е.Р. Черных // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 13–19.
- 28.Козлов, И.Г. Иммуноterapia: вчера, сегодня, завтра / И.В. Козлов, М.А. Тимаков // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 4. – С. 3–14.

29. Лебедев, К.А. Иммунофизиологические механизмы возникновения и поддержания опухолевого роста у человека / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина // Физиология человека. – 2010. – Т. 36, № 4. – С. 5–14.
30. Лядова, И.В. Реакция Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования / И.В. Лядова, В.Я. Гергерт // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – Т. 11. – С. 9–18.
31. Луговская, С.А. Иерархия гемопоэтических клеток: кинетика, структура и функции / С.А. Луговская, Т.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 7. – С. 25–32.
32. Маянский, А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунологические аспекты) / А.Н. Маянский // Иммунология. – 2001. – № 2. – С. 53–63.
33. Мейл, Д. Иммунология. пер. с англ. / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д.Б. Ройт. – М.: Логосфера, 2007. – 568 с.
34. Молекулярные механизмы развития инфекционного процесса / М.Г. Авдеев, В.В. Лебедев, М.Г. Шубич // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 4. – С. 15–22.
35. Молекулярно-генетические аспекты прогнозирования и иммунотерапии туберкулезной инфекции / В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 40–46.
36. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, 2006. – 544 с.
37. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 3. – С. 42–50.
38. Особенности иммунорегуляции у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.Е. Колосова и др. // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 2-3. – С. 267–272.
39. Особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина-2 и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных туберкулезом

- легких / А.А. Кошкина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – № 3-2. – С. 92–95.
40. Пащенко, М.В. Физиология клеток иммунной системы: дендритные клетки / М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2006. – № 6. – С. 368–378.
41. Показатели апоптоза и пролиферативной активности лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1–2. – С. 119–126.
42. Показатели иммунитета биологические свойства микобактерии при инфильтративном туберкулезе лёгких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Скворцова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2005. – № 11. – С. 14–18.
43. Применение системного иммуномодулятора ксимедона при деструктивных формах туберкулеза легких / Ю.Д. Слабнов, А.А. Визель, Г.В. Черепнев и др. // Проблемы туберкулеза. – 2000. – № 3. – С. 4–8.
44. Причины дизрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунитета / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–86.
45. Продукция IL-12 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови у больных туберкулезом легких в зависимости от спектра лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* / Хасанова Р.Р., Уразова О.И., Воронкова О.В. и др. // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 2. – С. 115–118.
46. Прокопович, С.К. Дендритные клетки и перспективы их использования в иммунотерапии злокачественных новообразований / С.К. Прокопович, В.Б. Винницкий // Онкология. – 2001. – Т. 3, № 2-3. – С. 126–131.
47. PD-1/B7-H1-опосредованная про-апоптогенная активность дендритных клеток как возможный механизм нарушения антиген-специфического ответа у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 59–66.

48. Ракофф-Наум, С. Роль Toll-подобных рецепторов в репарации и канцерогенезе / С. Ракофф-Наум, Р. Меджитов // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 5. – С. 690–698.
49. Реактивные изменения крови / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь и др. // Лабораторная гематология: учебное пособие – Москва.: Триада, 2006. – Разд. 2. – С. 83–105.
50. Регуляция физиологических функций дендритных клеток человека рекомбинантным белком теплового шока Hsp70 / М.А. Пальцев, С.Е. Северин, М.И. Данилевский и др. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – № 10. – С. 1011–1021.
51. Роль дендритных клеток в противотуберкулезном иммунитете / З.К. Хаитова, Р.Р. Хасанова, О.И. Воронкова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6, № 2. – С. 119–123.
52. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, О.В. Воронкова и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – Т. 88, № 3. – С. 3–7.
53. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в модуляции иммунного ответа при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова и др. // Иммунология. – 2012. – № 4. – С. 184–188.
54. Роль трансформирующего фактора роста  $\beta$  в формировании иммуносупрессии в онкогенезе / А.В. Чуров, Е.К. Олейник, В.М. Олейни // Цитокины и воспаление – 2009. – № 3. – С. 11–15.
55. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2008. – Т. 85, № 3. – С. 31–35.
56. Сахно, Л.В. Антигепрезинтирующие клетки при туберкулезе легких / Л.В. Сахно, Е.Р. Черных // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 1. – С. 3–9.
57. Сахно, Л.В. PD-1/B7-H1-опосредованная про-апоптогенная активность дендритных клеток как возможный механизм нарушения антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно,

- М.А Тихонова, Т.В. Тыринова // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 59–66.
58. Свирещевская, Е.В. Иммуитет при туберкулезе и аспергиллезе, проблемы медицинской микологии / Е.В. Свирещевская, В.С. Митрофанов, Р.И. Шендерова // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 3–13.
59. Сепиашвили, Р.И. Иммуные синапсы: от теории к клинической практике / Р.И. Сепиашвили, И.П. Балмасова // Молекулярная медицина. – 2008. – № 1. – С. 14–22.
60. Симбирцев, А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. – 2005. – № 6. – С. 368–377.
61. Синдром системного воспалительного ответа при туберкулезе легких / Г.О. Каминская, Р.Ю. Абдулаев, Е.В. Мартынова и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 40–48.
62. Современные технологии лабораторной медицины: учебное пособие / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова и др. – Томск : Печатная мануфактура, 2008. – 360 с.
63. Социальные аспекты множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза / О.В. Филинюк, О.И. Уразова, Е.В. Некрасов и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 167–170.
64. Субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток у пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении: Материалы IX российско-германской научно-практической конференции им Р. Коха и И.И. Мечникова. Новосибирск, 2010. – С. 257–258.
65. Субпопуляционный состав Т-регуляторных клеток и пролиферативный ответ лимфоцитов крови *in vitro* при туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия – 2012. – № 1. – С. 13–18.

66. Титов, В.Н. Роль макрофагов в становлении воспаления, действие интерлейкина-1, интерлейкина-6 и активность гипоталамо-гипофизарной системы / В.Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 12. – С. 3–10.
67. Тканевые и клеточные реакции легких при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / Ю.Р. Зюзя, Л.Н. Лепеха, Л.Е. Гедымин и др. // Проблемы туберкулеза. – 2004. – № 8. – С. 53–57.
68. Toll-подобные рецепторы и их адаптационные молекулы / А.И. Тухватулин, Д.Ю. Логунов, Д.Н. Щербинин и др. // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 9. – С. 1124–1243.
69. Уразова, О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких / О.И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – Т. 9, № 5. – С. 5–12.
70. Уразова, О.И. Цитокиновый статус у больных с множественной лекарственной устойчивостью // О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина // Российский иммунологический журнал. – 2011. – Т. 5, № 3-4. – С. 244.
71. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 103–111.
72. Фрейдлин, И.С. Интерлейкин-12 – ключевой цитокин иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 5–9.
73. Фенотип и функции дендритных клеток у больных хроническими вирусными гепатитами / О.Ю. Лепнина, М.А. Тихонова, А.Е. Борисова и др. // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 191–196.
74. Функциональная активность альвеолярных макрофагов при обострении туберкулеза легких / О.П. Макарова, Л.Н. Шишкина, А.П. Огиренко и др. // Проблемы туберкулеза и болезни легких. – 2003. – № 11. – С. 29–32.
75. Функциональные свойства моноцитарных дендритных клеток новорожденных в краткосрочных культурах / В.Ю. Талаев, О.Н. Бабайкина, М.А. Ломунова и др. // Клеточная иммунология. – 2008. – № 3. – С. 141–147.

76. Функциональные и цитохимические особенности фагоцитов у больных туберкулезом легких / О.В. Филинюк, Н.А. Земляная, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 24–27.
77. Хаитов, Р.М. Значение функциональной активности ТОЛЛ-подобных рецепторов и других рецепторов врожденной иммунной системы в физиологии почек / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенко // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 5. – С. 505–520.
78. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология / Р.М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 750 с.
79. Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р.М. Хаитов, М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–74.
80. Характеристика сигнальных путей, опосредующих цитотоксический эффект дендритных клеток против активированных Т-лимфоцитов и НК-клеток / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 43–50.
81. Хоченков, Д.А. Биология дендритных клеток / Д.А. Хоченков // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25, № 6. – С. 403–419.
82. Хоченков, Д.А. Роль дендритных клеток в иммунном ответе на Т-независимые антигены типа 2. / Д.А. Хоченков // Биологические мембраны. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 307–313.
83. Хоченков, Д.А. Взаимодействие дендритных клеток с В-лимфоцитами при ответе на Т-независимые антигены // Д.А. Хоченков, М.В. Гаврилова // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 51–58.
84. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Туберкулез и болезни легких – 2011. – № 5. – С. 209.

85. Чурина, Е.Г. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких: монография. – Томск: Печатная мануфактура. – 2013. – С. 84
86. Шепелькова, Г.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза на экспериментальных моделях / Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, А.С. Апт // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 7. – С. 3–11.
87. Эпидемиологические и иммунопатологические особенности Beijing-туберкулеза в Томской области / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – Т. 3, № 58. – С. 4–10.
88. Якушенко, Е.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе / Е.В. Якушенко, Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 355–364.
89. Ярилин, А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов / А.А. Ярилин // Иммунология. – 2010. – № 3. – С. 153–168.
90. Ярилин, А.А. Иммунология : учебник / А.А. Ярилин. – М. : Гэотар-Медиа, 2010. – С. 752.
91. A monovalent anti-human CD28 domain antibody antagonist: preclinical efficacy and safety / S.J. Suchard, P.M. Davis, S. Kansal et al. // J. Immunol. – 2013. – Vol. 191(9). – P. 4599–4610.
92. A linkage between dendritic cell and T-cell development in the mouse thymus: the capacity of sequential T-cell precursors to form dendritic cells in culture / K. Lucas, D. Vremec, L. Wu et al. // Dev. Comp. Immunol. – 1998. – N 22. – P. 339–349.
93. Akira, S. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity / S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho // Nature immunology. – 2001. – Vol. 2, N 8. – P. 675–680.
94. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD80/CD86 – CTLA4 pathway-modified immature dendritic cells promote xenograft survival [Electronic resource] / M. Tian, Y. Lu, C. Zhu et al. // Plos One. – 2013. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922766>

95. Antigen presentation in extracellular matrix: Interactions of T Cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential / M. Gunzer, A. Schafer, S. Borgmann et al. // *Immunity*. – 2000. – Vol. 13. – P. 323–332.
96. Antosz, H. Negative regulation of Toll-like receptor signaling [Electronic resource] / H. Antosz, D. Choroszynsk // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2013. – Vol. 67. – P. 339–350. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619234#>.
97. Association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and nontuberculosis mycobacterial lung disease in a Korean population / J.J. Yim, H.J. Kim, O.J. Kwon et al. // *Hum Immunol.* – 2008. – Vol. 69(9). – P. 572–576.
98. Benvenuti, F. Dendritic Cell Maturation Controls Adhesion, Synapse Formation, and the Duration of the Interactions with Naive T Lymphocytes / F. Benvenuti, C. Lagaudrie`re-Gesbert, I. Grandjean // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – P. 292–301.
99. Berrington, W.R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? [Electronic resource] / W.R. Berrington, T.R. Hawn // *Immunol. Rev.* – 2007. – Vol. 219. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mycobacterium%20tuberculosis%2C%20macrophages%2C%20and%20the%20innate%20immune%20response%3A%20does%20common%20variation%20matter%3F%20>.
100. Brombacher, F. IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses [Electronic resource] / F. Brombacher, R.A. Kastelein, G. Alber // *Trends of immunol.* – 2003. – Vol. 24(4). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=il-12%20family%20members%20shed%20light%20on%20the%20orchestration%20of%20Th1%20responses%20>.
101. Broj, V.G. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity [Electronic resource] / V.G. Broj, Z.J. Chen // *Nature*. – 2009. – Vol. 458(7237). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325622>.

102. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse / T. Pentcheva-Hoang, J.G. Egen, K. Wojnoonski et al. // *Immunity*. – 2004. – N 21(3). – P. 401–413.
103. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells / Y. Zheng, C.N. Manzotti, M. Liu et al. // *J. Immunol.* – 2004. – N 172. – P. 2778–2784.
104. Cell-autonomous and non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation / K. Wing, T. Yamaguchi, S. Sakaguchi // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol. 32(9). – P. 428–433.
105. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis [Electronic resource] / J. Zuniga, D. Torres-Carcia, T. Santos-Mendoza et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – Vol. 2012. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666281>
106. Chen, L. Molecular mechanisms of cell co-stimulation and co-inhibition / L. Chen, D.B. Flies // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13(4). – P. 227–242.
107. Chan, C.W. The ‘kiss of death’ by dendritic cells to cancer cells [Electronic resource] / C.W. Chan, F. Housseau // *Cell Death and Differentiation*. – 2008. – Vol. 15. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948029>.
108. Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma / P. Middel, S. Brauneck, W. Meyer et al. // *BMC Cancer*. – 2010. – N 10. – P. 576–578.
109. C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF- $\kappa$ B [Electronic resource] / I. S. Gringhuis, J. Dunnen, M. Litjens et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 26, N 5. – Mode of access: <http://www.cell.com/immunity/retrieve/pii/S1074761307002191>.
110. Cooper, A.M. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis / A.M. Cooper, S.A. Khader // *Immunol Rev.* – 2008. – Vol. 226. – P. 191–204.
111. Cooper, A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis / A.M. Cooper // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 393–422.

112. Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells / S. Kanada, C. Nishayama, N. Nakano et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 117, N 7. – P. 2211–2222.
113. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens / W.R. Heath, G.T. Belz, G.M.N. Behrens et al. // *Immun. Rev.* – 2004. – N 199. – P. 9–26.
114. D'Amico A. The Early Progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3 / A. D'Amico, L. Wu // *J. Exp. Med.* – 2003. – N 198. – P. 293–303.
115. Davis, D.M. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells / D.M. Davis // *Trends in Immunology*. – 2002. – Vol. 23, N 7. – P. 356–362.
116. DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF-, and Anti-Inflammatory Agents [Electronic resource] / M. Relloso, A. Puig-Kroger, O. Muniz Pello et al. // *J. Immunol.* – 2002. – N 168. – P. 2634–2643. – Mode of access: <http://www.jimmunol.org/content/168/6/2634>.
117. Demangel, C. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: Where the action starts / C. Demangel, W.J. Britton // *Immunology and Cell Biology*. – 2000. – N 78. – P. 318–324.
118. Dendritic cells activate and mature after infection with mycobacterium tuberculosis [Electronic resource] / A. Mihret, G. Mamo, M. Tafesse et al. // 2011. – N 4. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/247>.
119. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity / P. Guermonprez, R. Lo-Man, X. Jiao et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P.1294–1301.
120. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura [Electronic resource] / K. Sertl, T. Takemura, E. Tschachlery et al. // *J. Exp. Med.* – 1986. – Vol. 163(2). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dendritic%20cells%20with%20antigen->

presenting%20capability%20reside%20in%20airway%20epithelium%2C%20lung%20parenchyma%2C%20and%20visceral%20pleura%20.

121. Dendritic cells development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [Electronic resource] / D. Saunders, K. Lucas, J. Ismaili et al. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184(6). – Mode of access:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dendritic%20cells%20development%20in%20culture%20from%20thymic%20precursor%20cells%20in%20the%20absence%20of%20granulocyte%2Fmacrophage%20colony-stimulating%20factor%20>.
122. Dendritic cells in infectious disease, hypersensitivity, and autoimmunity / B. Gonzales, C. Guerra, D. Morris et al. // *International Journal of Interferon, Cytokines and Mediator Research.* – 2010. – N 2. – P. 137–147.
123. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors / M.G Manz, D. Traver, T Miyamoto et al. // *Blood.* – 2001. – N 97. – P. 3333–3341.
124. Dendritic cell-regulatory T-cell interactions control self-directed immunity [Electronic resource] // C. Lange, M. Durr, H. Doster et al. // *Immunol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 85(8). – Mode of access:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dendritic%20cell-regulatory%20T-cell%20interactions%20control%20self-directed%20immunity%20%20>.
125. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors / L. Wu, A. D'Amico, H. Hochrein et al. // *Blood.* – 2001. – N 98. – P. 3376–3382.
126. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells / F. Geissmann, M.G. Manz, M.H. Sieweke et al. // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 656–661.
127. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses / T.K. Means, B.W. Jones, A.B. Schromm et al. // *J. Immunol.* – 2001 – Vol. 15, N 166(6). – P. 4074–4082.
128. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: A role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation [Electronic

- resource] / M.C. Lebre, T. Burwell, P.L. Vieira et al. // *Immunology and Cell Biology*. – 2005. – Vol. 83. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Differential%20expression%20of%20inflammatory%20chemokines%20by%20Th1-%20and%20Th2-cell%20promoting%20dendritic%20cells%3A%20A%20role%20for%20different%20mature%20dendritic%20cell%20populations%20in%20attracting%20appropriate%20effector%20cells%20to%20peripheral%20sites%20of%20inflammation%20>.
129. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement / T. Nakahara, Y. Moroi, H.J. Uchi et al. // *J. Dermatol Sci.* – 2006. – Vol. 42(1). – P. 1–11.
130. Dinarello, C.A. Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein / C.A. Dinarello // *Ann. Rheum. Dis.* – 2000. – Vol. 59. – P. 17–20.
131. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages / S.K. Pathak, S. Basu, K.K. Basu et al. // *Nature Immunology*. – 2007. – Vol. 8, N 6. – P. 610–618.
132. Distinct TLRs *Mycobacterium tuberculosis* Is Due to Use of and Macrophages in Response to Disparity in IL-12 Release in Dendritic Cells / L. Pompei, S. Jang, B. Zamlyny et al. // *J Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 5192–5199.
133. Divergent effects of mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells [Electronic resource] / J. Mazurek, L. Ignatowicz, G. Kallenius et al. // *PLoS One*. – 2012. – N 7(8). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880012>.
134. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling / H. Shinohara, A. Inoue, N. Toyama-Sorimachi et al. // *J Exp Med*. – 2005. – Vol. 201. – P. 333–339.
135. Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture / D. Vremec, M. O’Keeffe, A. Wilson et al. // *Innate immune*. – 2011. – Vol. 17(3). – P. 338–352.

136. Forster, R. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance / R. Forster, C. Davalos-Miszlitz, A. Rot // *Nature reviews*. – 2008. – Vol. 8. – P. 362–371.
137. Foster, S.L. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modification [Electronic resource] / S.L. Foster, D.C. Hargreaves, R. Medwhitov // *Nature*. – 2007. – Vol. 447(7147). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gene-specific%20control%20of%20inflammation%20by%20TLR-induced%20chromatin%20modification>.
138. Fricke, I. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison [Electronic resource] / I. Fricke, D.I. Gabrilovich // *Immunol. Invest.* – 2006. – N 35(3-4). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dendritic%20cells%20and%20tumor%20microenvironment%3A%20a%20dangerous%20liaison%20>.
139. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells / P. Revy, M. Sospedra, B. Barbour et al. // *Nature Immunology*. – 2001. – Vol. 2, N 10. – P. 925–931.
140. Gabrielle, T.B. Transcriptional programming of the dendritic cell network / T.B. Gabrielle, L.N. Stephen // *Immunology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 101–113.
141. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy [Electronic resource] / G. Reinhard, A. Märten, S.M. Kiske et al. // *Br. J. Cancer*. – 2002. – Vol. 86(10). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085199>.
142. Gerdes, N. Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation-typing the balance in atherosclerosis? / N. Gerdes N., A. Zirlik // *Thrombosis and haemostasis*. – 2011. – Vol. 106, N 5. – P. 804–813.
143. Giacomini, E. Infection of Human Dendritic Cells with a Mycobacterium tuberculosis sigE Mutant Stimulates Production of High Levels of Interleukin-10 but Low Levels of CXCL10: Impact on the T-Cell Response [Electronic resource] / E. Giacomini, A. Sotolongo, E. Iona // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74(6). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Infection%20of%20Human%20Dendrit>

- ic%20Cells%20with%20a%20Mycobacterium%20tuberculosis%20sigE%20Mutant%20Stimulates%20Production%20of%20High%20Levels%20of%20Interleukin-10%20but%20Low%20Levels%20of%20CXCL10%3A.
144. Greaves, P. The role of B-7 family molecules in hematologic malignancy / P. Greaves, J.G. Gribben // *Blood*. – 2013. – Vol. 121(5). – P. 734–744.
145. Grewal, I.S. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation // I.S. Grewal, R.A. Flavell // *Immunol Rev.* – 1996. – Vol. 153. – P. 85–106.
146. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine / H. Ueno., N. Schmitt, E. Klechevsky et al. // *Immunological reviews*. – 2010. – Vol. 234. – P. 199–212.
147. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells [Electronic resource] / P. Serafini, R. Carbley, K.A. Noonan et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64(17). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342423>.
148. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors [Electronic resource] / L. Cochand, P. Isler, F. Songeon et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 163(2). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dendritic%20cells%20with%20antigen-presenting%20capability%20reside%20in%20airway%20epithelium%2C%20lung%20parenchyma%2C%20and%20visceral%20pleura%20>.
149. Human T-cells epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionary hyperconserved / I. Comas, J. Chakravarti, P.M. Small et al. // *Nat. Gene.* – 2011. – Vol. 42(6). – P. 498–450.
150. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naïve T cells by monocyte-derived dendritic cells / S. Agaoglu, E. Marcenaro, B. Ferranti et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, N 5. – P. 1776–1783.
151. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation /

- J. Geurtsen, S. Chedammi, J. Mesters et al. // *J. Immunol.* – 2009. – N 183(8). – P. 5221–5231.
152. Immunobiology of dendritic cells / J. Banchereau, F. Briere, C. Caux et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 767–811.
153. Interleukin-12p40 overexpression promotes interleukin-12p70 and interleukin-23 formation but does not affect bacille Calmette–Guérin and *Mycobacterium tuberculosis* clearance / M.L. Olleros, D. Vesin, E. Martinez-Soria et al. // *Immunology.* – 2007. – Vol. 122, N 3. – P. 350–361.
154. Kang, L. Origin and development of dendritic cells / L. Kang, M.C. Nussenzweig // *Immunological reviews.* – 2010. – Vol. 234. – P. 45–4.
155. Kawai, T. TLR signaling / T Kawai, S Akir // *Cell Death and Differentiation.* – 2006. – Vol. 13. – P. 816–825.
156. Keir, M.E. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 677–704.
157. Kooyk, Y. DC-SING: escape mechanism for pathogens / Y Kooyk, B.H. Geijtenbeek // *Immunology* – 2003. – Vol. 3 – P. 697–709.
158. Korbel, D.S. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth / D.S. Korbel, B.E. Schneider, U.E. Schaible // *Microbes and Infection.* – 2008. – Vol. 10. – P. 995–1004.
159. Leon, B. Monocyte-derived dendritic cells / B. Leon, M.L. Bravo, C. Ardavin // *Seminars in Immunology.* – 2005. – Vol. 17. – P. 313–318.
160. Liu, K. Origin and development of dendritic cells / K. Liu, M.C. Nussenzweig // *Immunol. Rev.* – 2010. – N 234(1). – P. 45–54.
161. Lin, C.H. Efficient expansion of regulatory T cell in vitro and in vivo with a CD 28 superagonist / C.H. Lin, T. Hunig // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 626–638.
162. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review / B.E. Lippitz // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol. 14(6). – P. 218–228.

163. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces / E. Woolf, I Grigorova, A Sagiv et al. // *Nature Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1076–1085.
164. Maturation inside and outside bone marrow dendritic cells modulated by interferon- $\alpha$  / Q. Song, Y. Meng, Y. Wang et al. // *Int. Immunopharmacol.* – 2013. – Vol. 17(3). – P. 843–849.
165. McKenzie, B.S. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway / B.S. McKenzie B.S., R.A. Kastelein, D.J. Cua // *Trends of Immunology.* – 2006. – Vol. 27, N 1. – P. 17–23.
166. Merad, M. Dendritic cell homeostasis / M. Merad, M.G. Manz // *Blood.* – 2009. – Vol. 113(15). – P. 3418–3427.
167. Merrill, J.T. Co-stimulatory molecules as target for treatment of lupus // J.T. Merrill // *Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 148. – P. 369–375.
168. Monocyte Signal Transduction Receptors in Active and Latent Tuberculosis [Electronic resource] / M. Druszczynska, M. Włodarczyk, B. Janiszewska-Drobinska et al. // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2013. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/851452>.
169. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response / V. Briken, S.A. Porcelli, G.S. Besra et al. // *Molecular Microbiology.* – 2004. – Vol. 53, N. 2. – P. 391–403.
170. Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile / L. Balboa, M.M. Romero, N. Yokobori et al. // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – N 88(7). – P. 716–726.
171. Mycobacterium tuberculosis Induces Differential Cytokine Production from Dendritic Cells and Macrophages with Divergent Effects on Naive T Cell Polarization 1. / S.P. Hickman, J. Chan, P. Salgame et al. // *J. Immunology.* – 2006. – Vol. 168. – P. 4636–4642.
172. Multidisciplinary analysis of chronic excretors of Mycobacterium tuberculosis bacilli / A. Kondo, M. Sakatani, T. Tsuchiya et al. // *Kekkaku.* – 1996. – N 71(1). – P. 25–29.

173. Negative regulation approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling [Electronic resource] / M.A. Anwar, S. Basith, S. Choi et al. // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2013. – Vol. 45. – Mode of access: <http://www.nature.com/emm/journal/v45/n2/full/emm201328a.html>
174. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis* [Electronic resource] / G. Ferwerda, S.E. Girardin, B.J. Kullberg et al. // *PLoS Pathog.* – 2005. – Vol. 1(3). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=NOD2%20and%20toll-like%20receptors%20are%20nonredundant%20recognition%20systems%20of%20Mycobacterium%20tuberculosis>.
175. NOD1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity [Electronic resource] / J.H. Fritz, L. Bourhis, G. Sellge et al. // *Immunity*. – 2007. – Vol. 26(4) – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=NOD1-mediated%20innate%20immune%20recognition%20of%20peptidoglycan%20contributes%20to%20the%20onset%20of%20adaptive%20immunity%20>.
176. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract [Electronic resource] / K.S. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura et al. // *Science*. – 2005. – Vol. 307(5710). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nod2-dependent%20regulation%20of%20innate%20and%20adaptive%20immunity%20in%20the%20intestinal%20tract>.
177. Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogen [Electronic resource] / J.-C. Sirard, C. Vignal, R. Dessein et al. // *Plos Pathog.* – 2007. – Vol. 3(12). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166077>
178. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heltbrock, P. Ancuta, S. Crowe et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, N. 16. – P. 74–80.
179. Palucka, K. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines / K. Palucka, J. Banchereau // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39(1). – P. 38–48.

180. Pel, M.J. Microbial recognition and evaluation of host immunity / M.J. Pel, C.M. Pieterse // *J. Exp. Bot.* – 2013. – Vol. 64. – P. 1237–1248.
181. Person, A.K. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV: shorter or longer? / A.K. Person, T.R. Sterling // *Curr HIV/AIDS Rep.* – 2012. – Vol. 9(3). – P. 259–266.
182. Production of Interleukin-18 in Human Tuberculosis / R. Vankayalapati, B. Wizel, S.E. Weis et al. // *The Journal of Infectious Diseases.* – 2000. – Vol. 182. – P. 234–236.
183. Profiles of IFN-g and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18 and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis / J.-S. Lee, C.-H. Song, C.-H. Kim et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 516–524.
184. Promoter Variation in the DC-SIGN–Encoding Gene CD209Is Associated with Tuberculosis [Electronic resource] / L.B. Barreiro, O. Neyrolles, C.L. Babb et al. // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3, N 2. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1324949/?tool=pubmed>.
185. Redford, P.S. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection / P.S. Redford, P.J. Murray, A. O'Garra // *Mucosal Immunol.* – 2011. – N 4(3). – P. 261–270.
186. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27 [Electronic resource] / M. Xu, I. Mizoguchi, N. Morishima et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2010. – Vol. 2010. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946577>.
187. Sabado, R.L. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment [Electronic resource] / R.L. Sabado, N. Bhardwaj // *Immunotherapy.* – 2010. – Vol. 2(1). – P. 37–56. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Directing%20dendritic%20cell%20immunotherapy%20towards%20successful%20cancer%20treatment%20>.
188. Saei, A. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease // A. Saei, J. Hadjati // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2013. – Vol. 164. – P. 293–303.

189. Saito, T. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells / T. Saito, T. Yokosuka // *Current Opinion in Immunology*. – 2006. – Vol. 18. – P. 305–313.
190. Sakamoto, K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection / K. Sakamoto // *Infectious Disease*. – 2012. – Vol. 49(3). – P. 423–429.
191. Sallusto, F. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *Arthritis Research*. – 2002. – Vol. 4, N 3. – P. 127–132.
192. Sallusto, F. Monocytes join the dendritic cell family / F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *Cell*. – 2010. – Vol. 143. – P. 339–340.
193. Sansom, D.M. What's the difference between CD80 and CD86? / D.M. Sansom, C.N. Manzotti, Y. Zheng // *TRENDS in Immunology*. – 2003. – Vol. 24, N 6. – P. 313–318.
194. Saunders, B.M. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis / B.M. Saunders, W.J. Britton // *Immunol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 85(2). – P. 103–111.
195. Schreiber, H.A. Dendritic Cells in Chronic Mycobacterial Granulomas Restrict Local Anti-Bacterial T Cell Response in a Murine Model [Electronic resource] / H.A. Schreiber, P.D. Hulseberg, J. Lee // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5(7). – Mode of access:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=72.%09Dendritic%20Cells%20in%20Chronic%20Mycobacterial%20Granulomas%20Restrict%20Local%20Anti-Bacterial%20T%20Cell%20Response%20in%20a%20Murine%20Model>.
196. Schettini, J. Physiological Role of Plasmacytoid Dendritic Cells and Their Potential Use in Cancer [Electronic resource] / J. Schettini, P. Mukherjee // *Immunity and Clin. Dev. Immunol.* – 2008. – Vol. 2008. – Mode of access:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190769>.
197. Szabo, A. Collaboration of Toll-like and Rig-I-like receptors in human dendritic cells: triggering antiviral innate immune responses / A. Szabo, E. Rajnavolgyi // *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 16, N. 2(3). – P. 195–207.

198. Svajgera, U. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity / U. Svajgera, M. Anderluhb, M. Jeras // *Cellular Signalling*. – 2010. – Vol. 22. – P. 1397–1405.
199. Src Homology 3-interacting Domain of Rv1917c of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Selective Maturation of Human Dendritic Cells by Regulating PI3K-MAPK-NF- $\kappa$ B Signaling and Drives Th2 Immune Responses / K. Bansal, A Y. Sinha, D.S. Ghorpade et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – N 285 (47). – P. 36511–36522.
200. Steinman, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future / R. M. Steinman // *Annu. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1–22.
201. Steinman, R.M. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity [Electronic resource] / R.M. Steinman, H. Hemmi // *Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol. 311. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%20Steinman%20R.M.%20Dendritic%20cells%3A%20translating%20innate%20to%20adaptive%20immunity>.
202. Steinman, R.M. Tollerogenic dendritic cells [Electronic resource] / R.M. Steinman, D. Hawiger, M.C. Nussenzweig // *Immunology*. – 2003. – Vol. 21. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615891>.
203. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation / A. Mansell, R. Smith, S.L. Doyle et al. // *Nat Immunol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 148–155.
204. Tailleux, L. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis [Electronic resource] / L. Tailleux // *PLoS Med.* – 2005. – Vol. 2(12) – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=DC-SIGN%20induction%20in%20alveolar%20macrophages%20defines%20privileged%20target%20host%20cells%20for%20mycobacteria%20in%20patients%20with%20tuberculosis%20>.
205. The immunological synapse / S.K. Bromley, W. R. Buracky, K.G. Johnson et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 375–396.

206. The immunological synapse: a molecular machine controlling T-cell activation / A. Grakoui, S.K. Bromley, C. Sumen et al. // *Science*. – 1999. – Vol. 285. – P. 221–227.
207. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells [Electronic resource] / R.M. Steinman, S. Turley, I. Mellman et al. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 83(5). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Differential%20expression%20of%20inflammatory%20chemokines%20by%20Th1-%20and%20Th2-cell%20promoting%20dendritic%20cells%3A%20A%20role%20for%20different%20mature%20dendritic%20cell%20populations%20in%20attracting%20appropriate%20effector%20cells%20to%20peripheral%20sites%20of%20inflammation%20>.
208. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal [Electronic resource] / G. Bakdash, S.P. Sittig, T. Dijk et al. // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 4, N. 53 – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450201>.
209. The Th17 family: flexibility follows function / R. Basu, R.D. Hatton, C.T. Weaver et al. // *Immunol Rev.* – 2013. – Vol. 252. – P. 83–103.
210. The Role of Foxp3-Expressing Regulatory T Cells and T Helpers in Immunopathogenesis of Multidrug Resistant Pulmonary Tuberculosis [Electronic resource] / E.G. Churina, O.I. Urazova, V.V. Novitskiy et al. // *Tuberculosis Research and Treatment*. – 2012. – Vol. 2012. – Mode of access: <http://www.hindawi.com/journals/trt/2012/931291>.
211. The role of dendritic cells in autoimmunity / D. Ganguly, S. Haak, V. Sisirak et al. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13(8). – P. 566–577.
212. The role of TLR2 in infection and immunity [Electronic resource] / L. Oliveira-Nascimento, P. Massari, L.M. Wetzley et al. // *Front Immunol.* – 2012. – Vol. 18, N 3. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566960>
213. TLR ligand-induced podosome disassembly in dendritic cells is ADAM17 dependent / M.A. West, A.R. Perscott, K.M. Chan et al. // *J. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 182. – N 5. – P. 993–1005.

214. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis* / M.G. Drage, N.D. Pecora, A.G. Hise et al. // *Cell Immunol.* – 2009. – Vol. 258(1). – P. 29–37.
215. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk / J. Brown, H. Wang, G.N. Hajishengallis et al. // *Journal of Dental Research.* – 2011. – N 90(4). – P. 417–427.
216. Toll-like Receptor 2 and DC-SIGNR1 Differentially Regulate Suppressors of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection / V. Srivastava, M. Manchanda, S. Gupta et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284(38). – P. 25532–25541.
217. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses / M. Schnare, G.M. Barton, A.C. Holt et al. // *Nat. Immunol.* – 2001. – N 2 (10). – P 947–950.
218. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease / A.E. Medvedev, I. Sabroe, J.D. Hasday et al. // *J. Endotoxin Res.* – 2006. – Vol. 12(3). – P. 133–150.
219. Trial watch: Toll-like receptors agonists for cancer therapy [Electronic resource] / E. Vacchelli, A. Eggermont, C. Sautes-Fridman et al. // *Oncoimmunology.* – 2013. – Vol. 2(8). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083080>
220. Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells / P. Gu, J.F. Gao, C. D'Souza et al. // *Cellular and Molecular Immunology.* – 2012. – Vol. 9. – P. 136–146.
221. Tseng, S.Y. CD80 cytoplasmic domain controls localization of CD28, CTLA-4, and protein kinase C $\alpha$  in the immunological synapse / S.Y. Tseng, M. Liu, M.L. Dustin // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 7829–7836.
222. Vadillo, E. Toll-like receptors in development and function of the hematopoietic system // E. Vadillo, R. Pelayo // *Rev. Invest. Clin.* – 2012. – Vol. 64. – P. 461 – 476.
223. Vermaelen, K. Pulmonary Dendritic Cells [Electronic resource] / K. Vermaelen, R. Pauwels // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2005. –

- Vol. 172(5). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879415>.
224. Watowich, S.S. Mechanisms regulation dendritic cell specification and development / S.S. Watowith, Y.J. Liu // *Immunol Rev.* – 2010. – Vol. 238. – P. 76–92.
225. Wesa, A.K. Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer [Electronic resource] / A.K. Wesa, W.J. Storkus // *Cell Death and Differentiation.* – 2008. – Vol. 15, N 51–57. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948028>.
226. Wu, L. Development of Dendritic Cell System / L. Wu, A. Dakic // *Cellular and Molecular Immunology.* – 2004 – Vol. 1, N 2. – P. 112–118.
227. Wu, L. Functional Evaluation of DC-SIGN Monoclonal Antibodies Reveals DC-SIGN Interactions with ICAM-3 Do Not Promote Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission / L. Wi, T.D. Martin, R. Vazeux // *Journal of virology* – 2002. – Vol.76, N 12. – P. 5905–5914.
228. Yasutomo, K. TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type [Electronic resource] // K. Yasutomo, B. Lucas, R.N. Germain // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 165(6). – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=78.%09TCR%20signaling%20for%20in%20initiation%20and%20completion%20of%20thymocyte%20positive%20selection%20h%20as%20distinct%20requirements%20for%20ligand%20quality%20and%20presenting%20%20cell%20type%20>.