

Игнатова Мария Сергеевна

**НАРУШЕНИЯ СИГНАЛЬНОГО JAK-STAT-ПУТИ АКТИВАЦИИ  
Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН, заслуженный деятель  
науки России

Новицкий  
Вячеслав Викторович  
Уразова  
Ольга Ивановна

доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией иммунофармакологии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фармакологии и регенеративной медицины  
имени Е.Д. Гольдберга»

Шерстобоев  
Евгений Юрьевич

доктор медицинских наук, старший  
научный сотрудник отделения  
патологической анатомии и цитологии  
ФГБНУ «Томский научно-исследовательский  
институт онкологии»

Савельева  
Ольга Евгеньевна

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

И.В. Петрова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Дисрегуляция иммунной системы на сегодняшний день рассматривается как один из ключевых факторов, способствующих развитию и прогрессированию туберкулезной инфекции. В связи с этим исследования, направленные на раскрытие молекулярных механизмов нарушений иммунного ответа при туберкулезе легких, становятся перспективными не только для понимания сути патогенеза болезни, но и поиска новых подходов к противотуберкулезной терапии, направленных на повышение ее эффективности. Особенно актуальным это становится в условиях постоянного увеличения доли микобактериальных штаммов, резистентных к препаратам традиционной противотуберкулезной химиотерапии, и расширения спектра их лекарственной устойчивости (Уразова О.И., 2010; Есимова И.Е. и соавт., 2012; Tan Q. et al., 2012).

Являясь примером инфекции с внутриклеточным типом паразитирования возбудителя, туберкулез характеризуется, прежде всего, дисрегуляцией иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитами-хелперами типа 1 (Th1) (Воронкова О.В. и соавт., 2007; Ивашкин В.Е., 2008; Schwander S., Dheda K., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2013). Особый интерес к клеткам данного типа определяется их способностью синтезировать интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), с которым связывают основные механизмы антимикобактериальной защиты. Данный цитокин поляризует дифференцировку наивных Т-лимфоцитов-хелперов (Th0) в направлении Th1-клеток, активирует их функции. Кроме того, IFN- $\gamma$  играет важную роль в активации макрофагов и НК-клеток, и оказывает, в целом, регуляторное влияние на формирование клеточного иммунитета (Сологуб Т.В. и соавт., 2006; Зенин В.В. и соавт., 2009; Ярилин А.А., 2010; Ahmad S., 2011; Sasindran S.J., Torrelles J.B., 2011; Lyadova I., 2012).

Учитывая важность продукции IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами для контроля над развивающейся туберкулезной инфекцией, необходимо отметить, что лишь в адекватных количествах он способен выполнять специфические функции по ограничению размножения и роста микобактерий в организме. Недостаточность или избыток цитокина может стать причиной неэффективности иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты исследований, посвященных анализу секреции IFN- $\gamma$  при туберкулезе, носят противоречивый характер. В одних случаях авторы указывают на снижение секреции цитокина, в других – на его гиперпродукцию при угнетении Т-клеточного звена иммунитета (Wood K., Sawitzki B., 2006; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Хасанова Р.Р. с соавт., 2008; Маркелова Е.В. и соавт., 2009; Kumar N.P. et al., 2013). Чем обусловлена такая разница в представленных результатах и каковы молекулярные механизмы нарушения IFN- $\gamma$ -продукции при туберкулезе – вопрос, который требует детального рассмотрения.

Известно, что основными индукторами продукции IFN- $\gamma$  Т-хелперами типа 1 являются интерлейкины (IL) 12 и 27, секретлируемые активированными макрофагами и дендритными клетками (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008;

Commins S.P. et al., 2010; Cocco C. et al., 2012; Hunter C.A., Kastelein R., 2012; Reeme A.E. et al., 2013). Взаимодействие цитокинов с рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов приводит к запуску сигнального JAK-STAT-пути, основными компонентами которого, применительно к Th1-иммунному ответу, являются тирозиновые янус-киназы JAK1, JAK2, TYK2 и транскрипционные факторы STAT1, STAT4 и T-bet (Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005; Абатуров А.Е., 2007; Murray P.J., 2007; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Malemud C.J., Pearlman E., 2009; Mendez-Samperio P., 2010; Fearon U., 2011; Cocco C. et al., 2012; Kaushal M., Chorawala N.M., 2012). Алгоритм IL-12/IL-27-опосредованной активации Т-лимфоцитов в целом известен. Тем не менее, механизмы и особенности внутриклеточной передачи сигнала цитокин-зависимой активации Т-клеток посредством факторов JAK-STAT-сигналинга при туберкулезной инфекции изучены недостаточно. Вопрос о существовании нарушений основных компонентов сигнальных JAK-STAT-путей активации Th1 и их связи с IFN- $\gamma$ -продуцирующей активностью иммунокомпетентных клеток в настоящее время остается открытым. В связи с этим представляется актуальным изучение активности ключевых компонентов сигнального JAK-STAT-каскада и ее взаимосвязи с продукцией IFN- $\gamma$ , как ключевого цитокина иммунного Th1-ответа, на фоне специфического воспаления при туберкулезе.

**Степень разработанности темы исследования.** В свете выявленной роли нарушений Т-клеточного звена иммунитета в патогенезе туберкулезной инфекции большое внимание уделяется изучению пролиферативной и цитокин-секреторной активности Т-лимфоцитов, а также раскрытию механизмов формирования иммуносупрессии и активации процессов апоптотической гибели Т-клеток. При этом практически неисследованными остаются молекулярные механизмы дисрегуляции цитокин-опосредованной активации Т-лимфоцитов на начальных этапах реализации Th1-ассоциированного противои инфекционного иммунного ответа и связанных с ней нарушений молекулярных механизмов сигнальной трансдукции на уровне киназных каскадов и транскрипционных факторов в связи с клинической формой туберкулезной инфекции и биологическими свойствами инфицирующего штамма возбудителя.

**Цель исследования:** охарактеризовать роль нарушений JAK-STAT-сигнальной трансдукции в дисрегуляции IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов у больных с различными клинико-патогенетическими вариантами туберкулеза легких.

**Задачи исследования:**

1. Оценить содержание активных (фосфорилированных) форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах лимфоцитов крови после IL-12/IL-27-стимуляции клеток *in vitro* у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.

2. Оценить JAK-STAT-опосредованный ответ IL-12/IL-27-индуцированных *in vitro* Т-лимфоцитов по количеству CD3-позитивных клеток, содержащих активную форму транскрипционного фактора T-bet и внутриклеточный IFN- $\gamma$  (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>), у больных туберкулезом

легких.

3. Проанализировать базальную и ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированную секрецию IFN- $\gamma$  *in vitro* и ее связь с IFN- $\gamma$ -синтезирующей активностью Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких.

4. Охарактеризовать особенности нарушений JAK-STAT-трансдукции сигнала ИЛ-12/ИЛ-27-опосредованной активации Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование нарушений ключевых этапов ИЛ-12/ИЛ-27-опосредованной сигнальной трансдукции в Т-лимфоцитах периферической крови при различных клинко-патогенетических вариантах туберкулеза легких (ТЛ). Показано, что при ТЛ *in vitro* гиперсекреция (базальная и ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированная) IFN- $\gamma$  – маркерного цитокина Th1-лимфоцитов – сочетается с уменьшением численности CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> клеток при увеличении числа CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> клеток в условиях общей Т-лимфоцитопении. Также установлено, что у больных ТЛ имеет место снижение числа CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, содержащих транскрипционный фактор T-bet, повышающий экспрессию гена IFN- $\gamma$ . Максимально выраженный дефицит CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> клеток отмечается в случае диссеминированного лекарственно-устойчивого (ЛУ) ТЛ, тогда как содержание в крови CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup> лимфоцитов у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ, напротив, превышает норму. Продемонстрировано, что у всех больных ТЛ, независимо от клинической формы и варианта устойчивости возбудителя, в лизатах лимфоцитов крови отмечается снижение концентрации активных (фосфорилированных) форм компонентов сигнального JAK-STAT-пути – тирозиновых киназ (JAK1, JAK2, TYK2) и транскрипционных факторов (STAT1, STAT4), что препятствует реализации каскада внутриклеточных ИЛ-12/ИЛ-27-зависимых реакций, а следовательно, опосредует дисрегуляцию антигенспецифического иммунного ответа уже на начальном его этапе – активации Т-лимфоцитов и (о чем свидетельствует дефицит CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> клеток) дифференцировки Т-хелперов типа 1 (Th1). Сочетание указанных изменений с гиперсекрецией IFN- $\gamma$  *in vitro* при увеличении численности CD3-негативных IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> клеток обосновывает заключение о том, что основными клетками-продуцентами цитокина при ТЛ являются лимфоциты, не имеющие фенотипических маркеров Т-клеток (предположительно, натуральные киллеры).

**Практическое и теоретическое значение работы.** Полученные данные расширяют имеющиеся фундаментальные представления об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции и вносят дополнительный вклад в понимание молекулярных механизмов дисрегуляции иммунитета при туберкулезе легких. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения заболевания и патогенетически обоснованной таргетной терапии, направленной на коррекцию нарушений активации/супрессии киназных каскадов и факторов транскрипции иммунорегуляторных генов. Кроме того, они могут быть учтены при разработке

тест-систем для диагностики латентной туберкулезной инфекции на основе измерения стимулированной секреции IFN- $\gamma$  лейкоцитами (Т-лимфоцитами) цельной крови (IGRA – Interferon-Gamma Release Assays).

**Методология и методы исследования.** Для реализации поставленных задач выбраны высокоинформативные методы исследований, которые выполнялись на базе современных экспериментальных лабораторий ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и ЗАО «Томские клеточные технологии». В качестве материала исследования использовали лимфоциты венозной крови. Основные методы исследования:

1. Выделение, культивирование и индукция лимфоцитов крови с использованием рекомбинантных цитокинов IL-12 и IL-27.
2. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови, прошедших IL-12/IL-27-индукцию *in vitro*, с определением поверхностной молекулы CD3 (маркер Т-клеток), активной формы внутриклеточного транскрипционного фактора T-bet и внутриклеточного IFN- $\gamma$  (проточная цитофлуориметрия).
3. Оценка IFN- $\gamma$ -секреторной активности лимфоцитов (иммуноферментный анализ).
4. Определение содержания активных форм транскрипционных факторов (STAT1, STAT4) и тирозиновых киназ (JAK1, JAK2, TYK2) в лизатах лимфоцитов крови (иммуноферментный анализ).
5. Статистический анализ результатов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Дефицит активных (фосфорилированных) форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в IL-12/IL-27-индуцированных *in vitro* лимфоцитах у больных инфильтративным и диссеминированным (лекарственно-чувствительным, лекарственно-устойчивым) туберкулезом легких свидетельствует о дисрегуляции механизмов JAK1/TYK2-STAT1- и JAK2/TYK2-STAT4-трансдукции сигнала цитокин-зависимой активации клеток.
2. Следствием дисрегуляции Th1-иммунного ответа на этапе внутриклеточной JAK-STAT-трансдукции цитокинового сигнала при туберкулезе легких является нарушение дифференцировки и IFN- $\gamma$ -синтезирующей функции Т-лимфоцитов, что проявляется дефицитом общего количества CD3<sup>+</sup> клеток и числа их CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> субпопуляций в условиях направленной (Th1-поляризующей) *in vitro* индукции лимфоцитов IL-12 и IL-27.
3. Базальная и IL-12/IL-27-индуцированная гиперсекреция IFN- $\gamma$  *in vitro* при туберкулезе легких сочетается с увеличением IFN- $\gamma$ -синтезирующей активности CD3-негативных лимфоцитов в условиях дефицита IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток.
4. Проявления нарушений JAK-STAT-опосредованной активации Т-лимфоцитов в ответ на индукцию цитокинами (IL-12, IL-27) *in vitro* при туберкулезе легких являются сходными вне зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии с наибольшей их выраженностью при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается достаточным объемом клинико-экспериментального материала, использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов исследования (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ), высокотехнологичного оборудования и адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XVIII Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2012), Итоговой 71-й студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2012), Всероссийской 72-й итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2013), на научно-образовательных семинарах на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2012-2014), на научных семинарах кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2012-2014).

Работа осуществлена 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 (НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7) 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 9 работ, из них 2 полнотекстовых статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель включает 239 наименований, из них 101 отечественных и 138 зарубежных источников. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях лично автором.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, задачи исследования, научная новизна, практическое и теоретическое значение работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** представлен анализ современной научной литературы по теме исследования, а именно, описаны основные этапы формирования иммунного ответа на *M. tuberculosis*, участие различных субпопуляций иммунокомпетентных

клеток в его реализации. Обоснована роль интерферона  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) в формировании иммунитета при туберкулезной инфекции, охарактеризованы основные защитные функции цитокина. Важная часть главы посвящена описанию функционирования JAK-STAT-сигнальной системы: рассмотрены основные компоненты и механизмы внутриклеточной передачи активационного сигнала в Т-лимфоцитах. Проанализированы основные и альтернативные пути индукции секреции IFN- $\gamma$ .

**Во второй главе** диссертации описаны материал и методы исследования. В ходе выполнения работы было обследовано 97 пациентов (75 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 20 до 55 лет с впервые выявленным инфильтративным (48 (49,48%) человек) и диссеминированным (49 (50,52%) человек) туберкулезом легких (ТЛ). Все обследованные больные ТЛ находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице. Диагноз ТЛ выставлялся на основании анамнеза больного, клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты.

Исследования проводились до начала больным ТЛ специфической противотуберкулезной химиотерапии. Критериями исключения больных ТЛ из исследования считались: возраст младше 20 и старше 55 лет; наличие других клинических форм туберкулезной инфекции; наличие аллергии и сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза в стадии обострения; терапия глюкокортикоидами и иммуномодулирующими препаратами; у женщин детородного возраста исключалась беременность.

Помимо клинической формы ТЛ при проведении исследований учитывалась чувствительность возбудителя (*M. tuberculosis*) к препаратам специфической противотуберкулезной химиотерапии. Всего были обследованы 51 (52,58%) пациент с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и 46 (47,42%) пациентов с лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ).

В контрольную группу вошли 35 практически здоровых добровольцев с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Экспериментальные исследования выполнялись в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии при кафедре патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и лаборатории ЗАО «Томские клеточные технологии».

В работе были исследованы лимфоциты венозной гепаринизированной (25 Ед/мл) крови, взятой утром натощак из локтевой вены в объеме 10 мл.

Определение общего количества лейкоцитов (ОКЛ) и содержания лимфоцитов в периферической крови проводили на гематологическом анализаторе МЕК-6400 («Nihon Kohden», Япония).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколлюрографина ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>). Лимфоциты из взвеси мононуклеарных лейкоцитов выделяли методом адгезии к пластику.

Подсчет количества лимфоцитов в суспензии осуществляли стандартным гематологическим методом. Концентрацию жизнеспособных клеток в суспензии оценивали по данным трипанового теста. Для исследований использовали

клеточные суспензии, жизнеспособность клеток в которых была не менее 95%.

Специфическую индукцию лимфоцитов осуществляли путем добавления индукторов Th1-пролиферативного ответа (рекомбинантных цитокинов интерлейкина (IL) 12 и 27 («Bioscience Company», США) в дозах 20 нг/мл и 10 нг/мл соответственно) и блокатора внутриклеточного транспорта моненсина («Sigma», США) (5 мкг/мл). Время инкубации с индукторами в зависимости от анализируемого параметра составляло: в случае оценки содержания в клетках активных форм транскрипционных факторов T-bet, STAT и тирозиновых киназ – 1 ч, внутриклеточного IFN- $\gamma$  – 10 ч, секреции IFN- $\gamma$  – 48 ч.

Клеточные лизаты для определения содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1, STAT4 и тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 готовили с использованием лизирующего буфера (протокол «Cell Signaling Technology», США).

Для оценки базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  в супернатантах культуральных суспензий лимфоцитов, определения содержания активных форм факторов транскрипции STAT1, STAT4 и тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» анализ, согласно методическим рекомендациям фирмы-производителя («Cusabio Biotech», США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия).

Определение внутриклеточного IFN- $\gamma$  и активной формы транскрипционного фактора T-bet в T-лимфоцитах периферической крови проводили методом проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр «FACS Calibur Flow cytometr BD», «Becton Dickinson», США) с помощью моноклональных антител, меченных флуоресцентными метками (FITC к T-bet, PE к IFN- $\gamma$ , PerCP к CD3) («R&D Systems», США).

Статистическую обработку результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 17.0) фирмы «Statsoft Inc.». Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовали тест Шапиро-Вилка. При сравнении анализируемых выборок проверяли гипотезу о равенстве их генеральных дисперсий с помощью критерия Фишера. В случае нормального распределения признака в исследуемых выборках и равенстве их генеральных дисперсий проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, при различных дисперсиях – с помощью критерия Аспина-Уэлча. Для оценки статистической значимости отличий между выборками с ненормальным распределением и равными дисперсиями использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, при различных дисперсиях – критерий Уолда-Вольфовита. С целью установления взаимосвязей между изучаемыми количественными показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона (нормальное распределение) и Спирмена (ненормальное распределение). При уровне значимости  $p < 0,05$  различие двух сравниваемых величин считали достоверным (Флейс Дж., 1989; Боровиков В.П., 2003; Бронштейн И.Н., Семендяев К.А., 2009).

**Третья глава** диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками. Сравнение анализируемых параметров проведено в зависимости от клинической формы (инфильтративный или диссеминированный) и варианта (лекарственно-чувствительный или лекарственно-устойчивый) ТЛ.

**Четвертая глава** диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением данных современной литературы по изучаемой теме.

В настоящее время не вызывает сомнений, что ключевое значение в формировании эффективного иммунного ответа на внедрение *M. tuberculosis* играет кооперативное взаимодействие антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов, обеспечивающее распознавание, уничтожение и элиминацию возбудителя заболевания из организма (Ярилин А.А., 2010). Являясь иммунозависимым заболеванием, ТЛ характеризуется дисрегуляцией иммунных процессов, важную роль в патогенезе которой отводят нарушению структурно-функционального состояния Т-лимфоцитов (Herrera M.T. et al., 2009; Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г., 2010; Ярилин А.А., 2010; Есимова И.Е. и соавт., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013). Т-лимфоциты являются главными регуляторными и эффекторными клетками иммунного ответа на внутриклеточные патогены. Т-лимфоциты и их цитокины определяют практически полный спектр клеточных реакций иммунитета, включая реакцию гиперчувствительности замедленного типа, разновидностью которой является гранулематозное воспаление при туберкулёзной инфекции. Т-лимфоциты осуществляют регуляцию фагоцитоза и лизиса микобактерий макрофагами и формирование специфического противотуберкулезного иммунитета (Воронкова О.В. и соавт., 2007; Новицкий В.В. и соавт., 2008; Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г., 2010; Киселева Е.П., 2011; Aksu K. et al., 2012). В связи с этим вероятность заболевания туберкулезом во многом определяется количеством и функциональным состоянием данной популяции клеток.

С этих позиций нами было проанализировано общее количество лейкоцитов (ОКЛ), лимфоцитов и содержание Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) в периферической крови у больных ТЛ. Результаты показали, что у больных ТЛ, независимо от клинической формы заболевания и варианта лекарственной чувствительности возбудителя к препаратам специфической химиотерапии, ОКЛ превышает норму, что может быть связано с характерным для ТЛ увеличением числа нейтрофилов и моноцитов в крови вследствие мобилизации клеток из маргинального пула и их костномозгового резерва, активации процессов пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц грануломоноцитопозеза под влиянием медиаторов воспаления, продуктов тканевого распада и вирулентных факторов возбудителя инфекции (Кравцов А.Л. и соавт., 2007; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Титов Л.П., Карпов И.А., 2008; Иванов А.К., 2009; Lyadova I., 2012; Правада Н.С. и соавт., 2013). Наряду с этим у больных ТЛ была зарегистрирована лимфоцитопения, по-видимому, напрямую связанная с Т-лимфоцитопенией (уменьшением количества CD3-позитивных клеток в крови). Возможными патогенетическими факторами

уменьшения популяции Т-клеток, в свою очередь, могли быть: прямое действие туберкулезных токсинов на лимфоидную ткань, подавление пролиферации и дифференцировки лимфоцитов; массовая гибель Т-клеток в очаге воспаления, что способствует их быстрой миграции из циркуляторного русла; активация механизмов иммуносупрессии и апоптоза Т-клеток (Пичугин А.В., Апт А.С., 2005; Иванов А.К., 2009; Уразова О.И., 2010; Ярилин А.А., 2010; Aksu K. et al., 2012; Cavalcanti Y. et al., 2012; Есимова И.Е. и соавт., 2012; Zuñiga J. et al., 2012; Marino S. et al., 2012; Tan Q. et al., 2012; El-Kebir M. et al., 2013).

Следствием дефицита Т-клеток является дисрегуляция Th1-иммунного ответа, один из показателей которой – нарушение продукции Т-клетками IFN- $\gamma$ , ключевого цитокина противотуберкулезного иммунитета, обеспечивающего «полноценность» эффекторной его стадии (Абатуров А.Е., 2007; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Cavalcanti Y. et al., 2012). Вместе с этим, анализ данных, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, показал, что у больных инфильтративным и диссеминированным ТЛ на фоне уменьшения количества CD3<sup>+</sup> клеток в крови отмечалось не понижение, а напротив, увеличение базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  *in vitro* с наибольшей его выраженностью у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ (Таблица 1).

Таблица 1 – Секреция IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц		Базальная секреция, пг/мл	IL-12/IL-27-индуцированная секреция, пг/мл
Здоровые доноры		33,11 (17,94-40,15)	65,30 (59,28-85,34) p <sub>4</sub> <0,001
Больные инфильтративным туберкулезом легких	ЛЧ	87,45 (47,54-106,00) p <sub>1</sub> <0,001	194,65 (150,22-259,32) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,001
	ЛУ	96,85 (61,40-114,50) p <sub>1</sub> <0,001	202,18 (170,10-248,11) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,001
Больные диссеминированным туберкулезом легких	ЛЧ	93,71 (68,18-121,41) p <sub>1</sub> <0,001	254,60 (216,17-298,63) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,05; p <sub>4</sub> <0,001
	ЛУ	101,47 (68,66-127,12) p <sub>1</sub> <0,001	305,38 (201,43-373,02) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,05; p <sub>4</sub> <0,001

*Примечание* – ЛЧ – лекарственно-чувствительный; ЛУ – лекарственно-устойчивый; p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – у больных с инфильтративным туберкулезом легких; p<sub>4</sub> – с показателями базальной секреции.

Одной из вероятных причин гиперсекреции IFN- $\gamma$  *in vitro* в условиях дефицита CD3<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ТЛ может быть активация механизмов внутриклеточной трансдукции сигналов с поверхностных рецепторов, стимулирующих клетки к интерферонопродукции (Минеев В.Н. и соавт., 2010). Цитокины семейства IL-12 (IL-12 и IL-27), как известно, являются основными индукторами секреции IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами. Важное значение при этом отводится IL-12-опосредованной трансдукции активационного стимула от

поверхности к ядру клетки посредством сигнального JAK-STAT-пути (Kaushal M., Chorawala N.M., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013). Обязательным условием реализации IL-12-зависимой стимуляции Th1-лимфоцитов является экспрессия на клетках  $\beta 2$ -субъединицы рецептора к IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ), которая, в свою очередь, обеспечивается активацией транскрипционного фактора T-bet в каскаде реакций сигнального JAK1/ТYK2-STAT1-пути, который запускается при взаимодействии Th1-лимфоцита с IL-27 (Thieu V.T. et al., 2008). Только после экспрессии индуцибельной  $\beta 2$ -субъединицы IL-12R ( $\beta 1$ -субъединица рецептора является конститутивной) и формирования полноценного  $\beta 1/\beta 2$ -рецептора клетки приобретают способность отвечать на действие IL-12, что приводит к запуску другой ветви сигнального каскада – JAK2/ТYK2-STAT4 (Рисунок 1), следствием чего является экспрессия гена *INFG* и синтез контролируемого им цитокина (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Lupov I.P. et al., 2011). IL-12-опосредованная активация T-bet в каскаде реакций JAK2/ТYK2-STAT4-сигналинга стимулирует секрецию IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами в количестве, необходимом для обеспечения оптимального режима противоинфекционной защиты (Минеев В.Н. и соавт., 2010; Robinson C.M. et al., 2010; Lazarevich V., Glimcher L.H., 2011; Gao B. et al., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013).

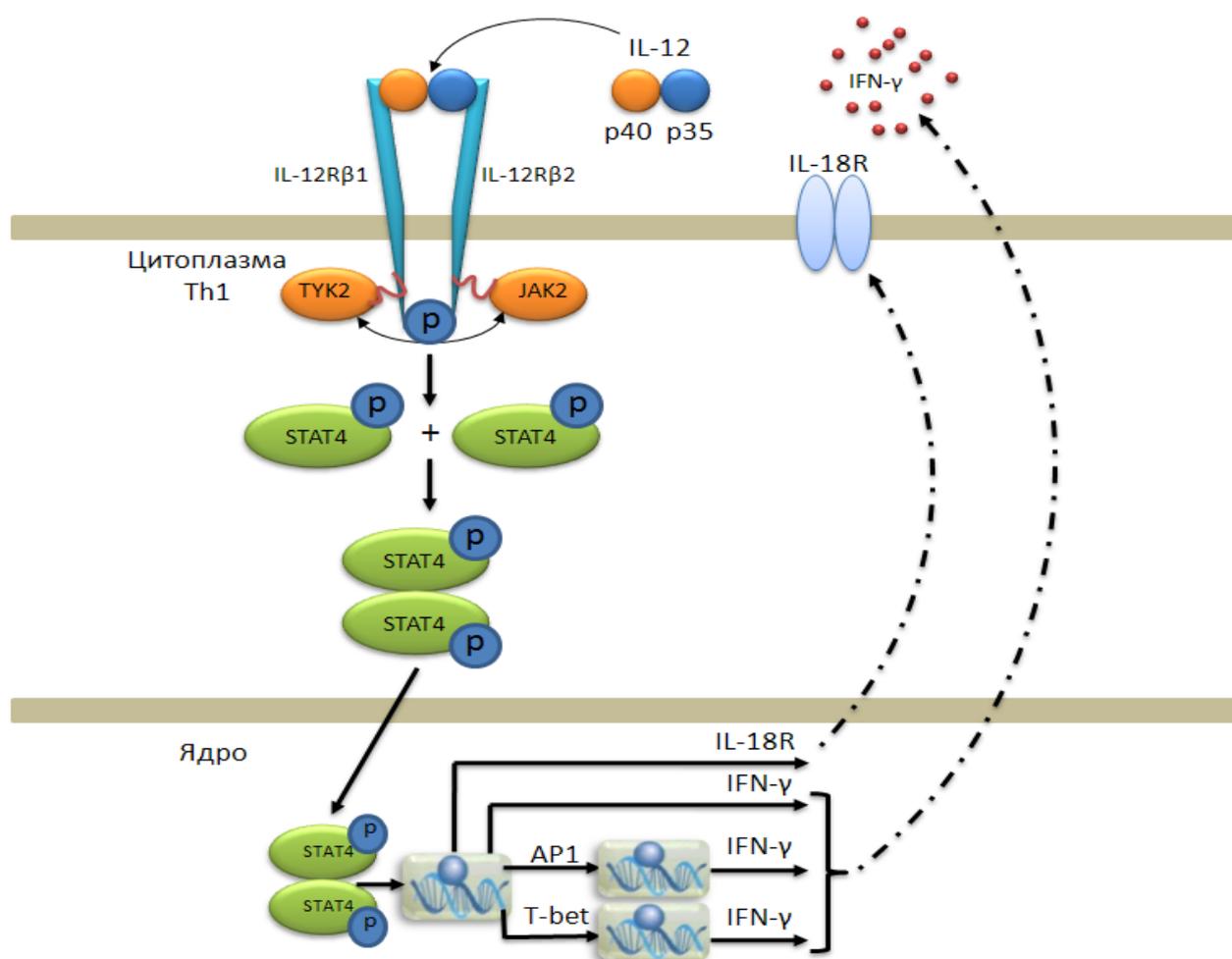


Рисунок 1 – IL-12-зависимая активация сигнального пути JAK-STAT в лимфоцитах (схема составлена по данным литературы)

Как показали результаты проведенного исследования, у всех больных ТЛ, независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к препаратам этиотропной терапии, было зарегистрировано снижение содержания активных (фосфорилированных, p-) форм тирозинкиназ p-JAK1, p-JAK2, p-ТҮК2 и факторов транскрипции p-STAT1, p-STAT4 в лизатах лимфоцитов крови относительно соответствующих показателей у здоровых доноров. При этом наиболее низкой концентрация фактора p-STAT4 была при диссеминированном ЛУТЛ (Таблица 2).

Таблица 2 – Содержание активных форм тирозинкиназ JAK1, JAK2, ТҮК2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах лимфоцитов крови после IL-12/IL-27-индукции *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Me (Q1-Q3)

Показатель	Группы обследованных лиц				
	Здоровые доноры	Инфильтративный ТЛ		Диссеминированный ТЛ	
		ЛЧ	ЛУ	ЛЧ	ЛУ
p-JAK1, пг/мл	20,89 (20,18-21,79)	17,75 (17,30-19,76) $p_1 < 0,05$	16,31 (15,70-16,86) $p_1 < 0,05$	18,76 (17,10-19,48) $p_1 < 0,05$	15,44 (15,12-16,90) $p_1 < 0,05$
p-JAK2, пг/мл	18,62 (17,29-18,95)	15,22 (15,03-16,40) $p_1 < 0,05$	14,95 (13,71-16,42) $p_1 < 0,05$	16,62 (15,73-17,48) $p_1 < 0,05$	14,03 (13,20-14,51) $p_1 < 0,05$
p-ТҮК2, пг/мл	20,91 (18,90-23,32)	13,26 (12,80-15,00) $p_1 < 0,01$	12,60 (12,10-12,83) $p_1 < 0,001$	14,14 (13,80-14,75) $p_1 < 0,01$	12,04 (11,62-14,73) $p_1 < 0,001$
p-STAT1, пг/мл	46,54 (31,80-55,53)	29,43 (24,78-40,53) $p_1 < 0,01$	20,02 (19,64-21,45) $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	22,20 (20,11-30,89) $p_1 < 0,001$	20,26 (19,87-29,96) $p_1 < 0,001$
p-STAT4, пг/мл	24,55 (17,92-30,00)	19,65 (13,71-22,92) $p_1 < 0,05$	16,75 (12,74-18,55) $p_1 < 0,01$	19,70 (14,81-20,35) $p_1 < 0,05$	11,07 (10,10-16,92) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$

*Примечание* – здесь, в Таблице 3 и в Рисунке 2:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри каждой клинической формы).

Что касается транскрипционного фактора T-bet, то во всех группах обследованных больных ТЛ отмечалось снижение числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов, также наиболее выраженное при диссеминированном ЛУТЛ, в сочетании (при инфильтративном ЛУТЛ) с увеличением количества CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup> клеток (Таблица 3).

Возможным фактором снижения содержания p-JAK1, p-JAK2, p-ТҮК2 и активируемых ими p-STAT1 и p-STAT4 (Таблица 2) в лимфоцитах при направленной IL-12/IL-27-индукции клеток в эксперименте *in vitro* у больных ТЛ может быть нарушение процессов, связанных с экспрессией на их поверхности IL-12Rβ2. Среди них, как правило, выделяют: дефицит активирующих цитокинов

(в данной работе исключается, так как при моделировании *in vitro* цитокин-зависимой активации лимфоцитов в качестве индукторов использовались рекомбинантные ИЛ-12 и ИЛ-27 в адекватных (иммунологических) дозах); дефицит или аномалию поверхностных (цитокиновых) рецепторов на клетках-мишенях (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Villarino A. et al., 2008); дефицит сигнальных молекул (в том числе их неактивных предшественников). Косвенно на нарушение ИЛ-27-рецепции с последующим нарушением активации Т-лимфоцитов может указывать выявленная нами положительная взаимосвязь между содержанием p-TYK2 и p-STAT1 в лизатах лимфоцитов у больных инфильтративным ЛУТЛ ( $r=0,76$ ,  $p<0,01$ ). Кроме того, установлена положительная корреляция между дефицитом p-TYK2 и p-STAT4 у больных инфильтративным ( $r=0,67$ ,  $p<0,05$ ) и диссеминированным ( $r=0,82$ ,  $p<0,01$ ) ЛУТЛ, что является еще одним косвенным доказательством справедливости данного предположения.

Таблица 3 – Количество ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированных *in vitro* CD3<sup>+</sup> клеток, содержащих транскрипционный фактор T-bet, у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	CD3 <sup>+</sup> T-bet <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> T-bet <sup>-</sup>
	в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, ×10 <sup>9</sup> /л	
Здоровые доноры	$\frac{33,75 (30,44-38,31)}{0,501 (0,437-0,682)}$	$\frac{38,16 (34,12-41,89)}{0,574 (0,418-0,749)}$
Инфильтративный ЛЧТЛ	$\frac{16,53 (14,37-19,69)}{0,226 (0,155-0,302)}$ $p_1<0,001$	$\frac{38,97 (35,00-44,06)}{0,549 (0,316-0,996)}$
Инфильтративный ЛУТЛ	$\frac{13,21 (11,72-16,80)}{0,199 (0,149-0,330)}$ $p_1<0,001; p_3<0,05$	$\frac{51,72 (48,20-54,94)}{0,818 (0,520-1,005)}$ $p_1<0,01; p_3<0,001$ $p_1<0,05$
Диссеминированный ЛЧТЛ	$\frac{17,65 (15,49-18,67)}{0,270 (0,160-0,420)}$ $p_1<0,001$	$\frac{38,27 (35,35-43,06)}{0,560 (0,460-1,050)}$
Диссеминированный ЛУТЛ	$\frac{9,78 (7,92-12,11)}{0,174 (0,125-0,205)}$ $p_1<0,001; p_2<0,01; p_3<0,001$ $p_1<0,001; p_3<0,001$	$\frac{36,23 (32,71-39,56)}{0,644 (0,478-0,691)}$ $p_2<0,001$ $p_2<0,001$

Наряду с измерением базальной и ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  *in vitro* у больных ТЛ проводилась оценка внутриклеточного содержания данного цитокина, в результате которой выявлено снижение численности CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> лимфоцитов на фоне увеличения количества CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> клеток. Наиболее выраженными данные изменения были в

группе больных диссеминированным ЛУТЛ. Содержание IFN- $\gamma$ -негативных Т-клеток ( $CD3^+IFN-\gamma^-$ ) и  $CD3^-IFN-\gamma^+$  лимфоцитов при инфильтративном ЛУТЛ не отличалось от нормы (Рисунок 2).

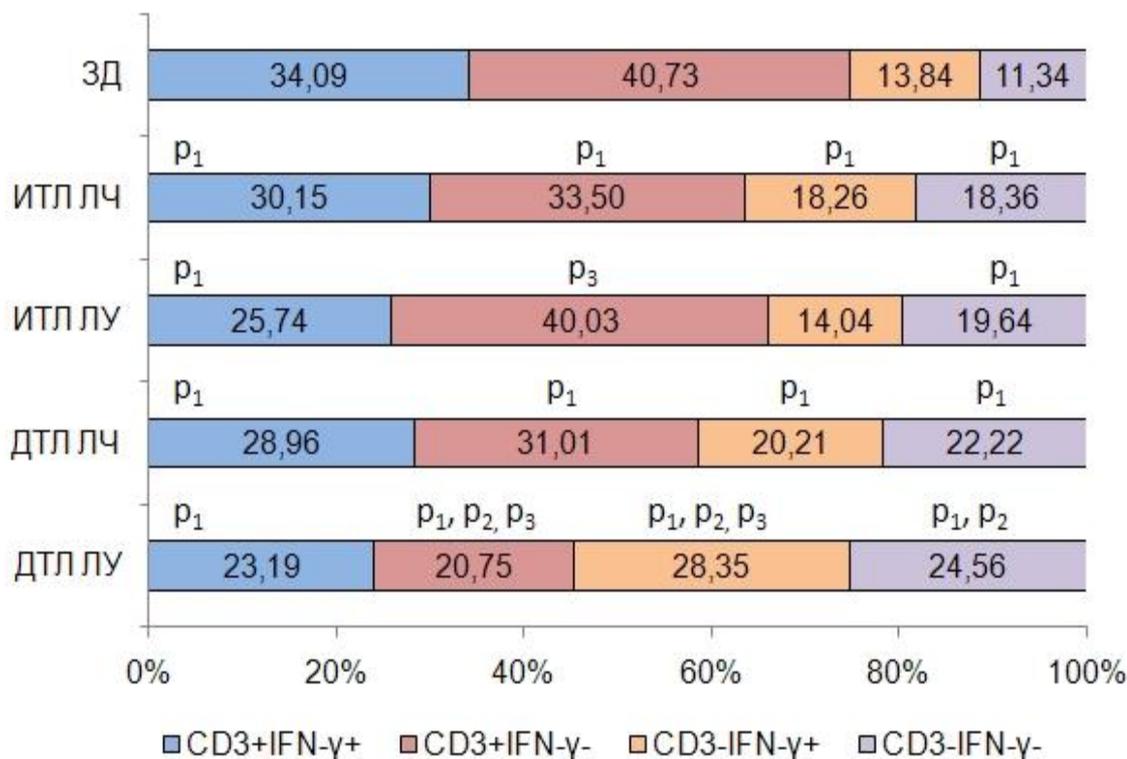


Рисунок 2 – Количество IL-12/IL-27-индуцированных  $CD3^+$  и  $CD3^-$  лимфоцитов, позитивных и негативных по внутриклеточному содержанию IFN- $\gamma$ , у здоровых доноров и больных туберкулезом легких

*Примечание* – ЗД – здоровые доноры; ИТЛ ЛЧ – инфильтративный лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ИТЛ ЛУ – инфильтративный лекарственно-устойчивый туберкулез легких; ДТЛ ЛЧ – диссеминированный лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ДТЛ ЛУ – диссеминированный лекарственно-устойчивый туберкулез легких.

Учитывая это, а также тот факт, что увеличение секреции IFN- $\gamma$  *in vitro* сочеталось с дефицитом активных компонентов JAK-STAT-сигнального пути и транскрипционного фактора T-bet в Т-клетках, следует полагать, что гиперсекреция IFN- $\gamma$ , скорее всего, опосредована не Th1-клетками, а связана с усилением цитокинсекреторной активности лимфоцитов других ( $CD3^-$  негативных) субпопуляций, в частности «натуральных киллеров» (NK-клеток), имеющих, по-видимому, отличный от Т-лимфоцитов-хелперов IL-12-опосредованный путь активации, приводящий к экспрессии гена IFN- $\gamma$  (Сологуб Т.В. и соавт., 2006; Абатуров А.Е., 2007; Grant L.R. et al., 2008; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Kondadasula S.V. et al., 2008; Robinson C.M. et al., 2010; Goldszmid R.S. et al., 2012; Соснина А.В. и соавт., 2013).

Увеличение численности NK-лимфоцитов, сопряженное с усилением IFN- $\gamma$ -продукции при ТЛ, показано во многих исследованиях (Абатуров, А.Е., 2007; Хасанова Р.Р., 2009; Воронкова О.В. и соавт., 2010; Уразова О.И., 2010; Чурина

Е.Г. и соавт., 2010; Kupz A. et al., 2013). Подтверждением этому является зарегистрированное в настоящем исследовании увеличение числа  $CD3^+IFN-\gamma^+$  клеток в крови у больных ТЛ. Вероятно, усиление секреторной активности НК-клеток происходит с целью компенсации функциональной недостаточности Т-хелперов типа 1 – основных клеток противотуберкулезного иммунитета (Хасанова Р.Р. и соавт., 2008). Однако в литературе имеются сведения о том, что вырабатываемый НК-клетками  $IFN-\gamma$  не обладает эффектами своего Th1-лимфоцитарного гомолога и имеет ряд особенных (в том числе негативных) свойств (Кетлинский С. А., Симбирцев А. С., 2008; Kupz A. et al., 2013).

Негативное влияние НК-клеточного  $IFN-\gamma$  на иммунный ответ может быть связано с его способностью индуцировать экспрессию белков-супрессоров цитокиновой сигнализации в Т-клетках, основной функцией которых является блокирование передачи сигнала от цитокиновых рецепторов к транскрипционным факторам STAT. В настоящее время известно четыре группы таких ингибиторов – это белки SOCS (*suppressor of cytokine signaling*), PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*), SLIM (*STAT-interacting LIM domain possessing protein*) и Hlx (Минеев В. Н., Сорокина Л.Н., 2006, 2012; Palmer D.C., Restifo N.P., 2009; Lupov I.P. et al., 2011; Mirpuri J., Yarovinsky F., 2012). Белки-супрессоры способны влиять на активность компонентов JAK-STAT-сигнализации посредством их посттрансляционной модификации и последующей деградации в протеасомах, что приводит к снижению содержания активных форм тирозиновых киназ и факторов STAT (Lupov I.P. et al., 2011). В пользу данного утверждения может служить выявленная в настоящем исследовании отрицательная корреляция между содержанием p-STAT4 в лизатах лимфоцитов и секрецией  $IFN-\gamma$  *in vitro* у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ ( $r=0,56$ ;  $p<0,05$ ).

Вместе с тем имеются предположения, что секретируемый НК-клетками  $IFN-\gamma$  способен оказывать индуцирующее влияние на активность иммуносупрессорных Т-регуляторных клеток (Treg), которые также являются активными продуцентами  $IFN-\gamma$  (Wood K., Sawitzki B., 2006; Oldenhove G. et al., 2009; He X.-Y. et al., 2010; Venigalla R.K. et al., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013). Учитывая, что при ТЛ отмечается увеличение числа и функциональной активности Treg-клеток (Chen X. et al., 2007; Li L. et al., 2007; Новицкий В.В. и соавт., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2012), можно предположить, что данная субпопуляция Т-лимфоцитов вносит значительный вклад в гиперсекрецию  $IFN-\gamma$  и угнетение IL-12-зависимого JAK-STAT-сигналинга в Th1-клетках.

Гиперсекреция  $IFN-\gamma$ , опосредованная Treg, вероятно, более характерна для инфильтративного ЛУТЛ, так как на фоне значительного снижения числа  $CD3^+Tbet^+$  лимфоцитов (Таблица 3) и гиперсекреции  $IFN-\gamma$  (Таблица 1) у данных больных регистрировалось нормальное содержание общего числа  $CD3^-$  и  $IFN-\gamma^-$  позитивных лимфоцитов (Рисунок 1), в число которых входят и Treg-клетки. При этом увеличения численности  $CD3^+IFN-\gamma^+$  лимфоцитов, к которым относятся НК-лимфоциты, не отмечалось (Рисунок 2).

Известно, что  $IFN-\gamma$ , секретируемый Treg, способен ингибировать Т-клеточную дифференцировку и пролиферацию (через увеличение активности

белков-супрессоров JAK-STAT-сигналинга и выработку супрессорных цитокинов), а также индуцировать программу апоптоза Т-лимфоцитов (Wood K., Sawitzki B., 2006). Этим можно объяснить снижение численности CD3-позитивных лимфоцитов и их CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> субпопуляций при ТЛ, в особенности при диссеминированном ЛУТЛ, при котором указанные изменения были наиболее выраженными (Рисунок 2, Таблица 3).

Рассуждая об особенностях иммунопатогенеза отдельных клинических форм туберкулезной инфекции, важно отметить, что инфильтративный ТЛ является классическим примером заболевания, иммунный ответ при котором протекает по Th1-зависимому пути. Диссеминированный ТЛ, в свою очередь, является примером ареактивного течения инфекционного процесса с формированием патологической «иммунной девиации» в направлении Th2-зависимого ответа. Смещение Th1/Th2-баланса в сторону Th2-активации обусловлено патогенезом данной клинической формы ТЛ, для которой обязательным условием является наличие (хотя и очень кратковременное) бактериемии. Считается, что именно фактор бактериемии, когда патоген находится вне фагоцитирующей клетки и доступен для действия антител, является толчком для запуска иммунного ответа по Th2-пути (Мишин В.Ю., 2008; Хасанова Р.Р. и соавт., 2008; Иванов А.К., 2009; Sharma P.K. et al., 2009; Cherenko S.O. et al., 2013; Чурина Е.Г. и соавт., 2013). Следовательно, при сочетании диссеминированной формы ТЛ и лекарственной устойчивости возбудителя течение заболевания усугубляется, с одной стороны, развитием анергии Th1-клеток, индуцированной возбудителем с определенными биологическими свойствами, с другой – Th1/Th2-дисбалансом (Сахно Л.В. и соавт., 2004, 2006; Мишин В.Ю., 2008; Sharma P.K. et al., 2009; Уразова О.И., 2010; Скрыгина Е.М., 2013; Cherenko S.O. et al., 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что у больных ТЛ в условиях моделирования *in vitro* IL-12/IL-27-индукции лимфоцитов гиперсекреция IFN- $\gamma$  сочетается с дефицитом общего числа Т-клеток и их Th1-субпопуляции, о чем свидетельствует снижение количества CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов. Это характеризует нарушение процессов дифференцировки и активации Th1-лимфоцитов при действии цитокинов, секретируемых антигенпрезентирующими клетками. Молекулярную основу этого составляет нарушение внутриклеточной JAK-STAT-трансдукции сигнала активации в Т-лимфоцитах при низком содержании в них активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и транскрипционных факторов STAT1, STAT4. Полученные результаты обосновывают предположительный вклад в гиперпродукцию IFN- $\gamma$  при ТЛ других субпопуляций лимфоцитов, в частности натуральных киллеров и (что также возможно) Т-регуляторных лимфоцитов с иммуносупрессорной активностью (Рисунок 3).

## Mycobacterium tuberculosis

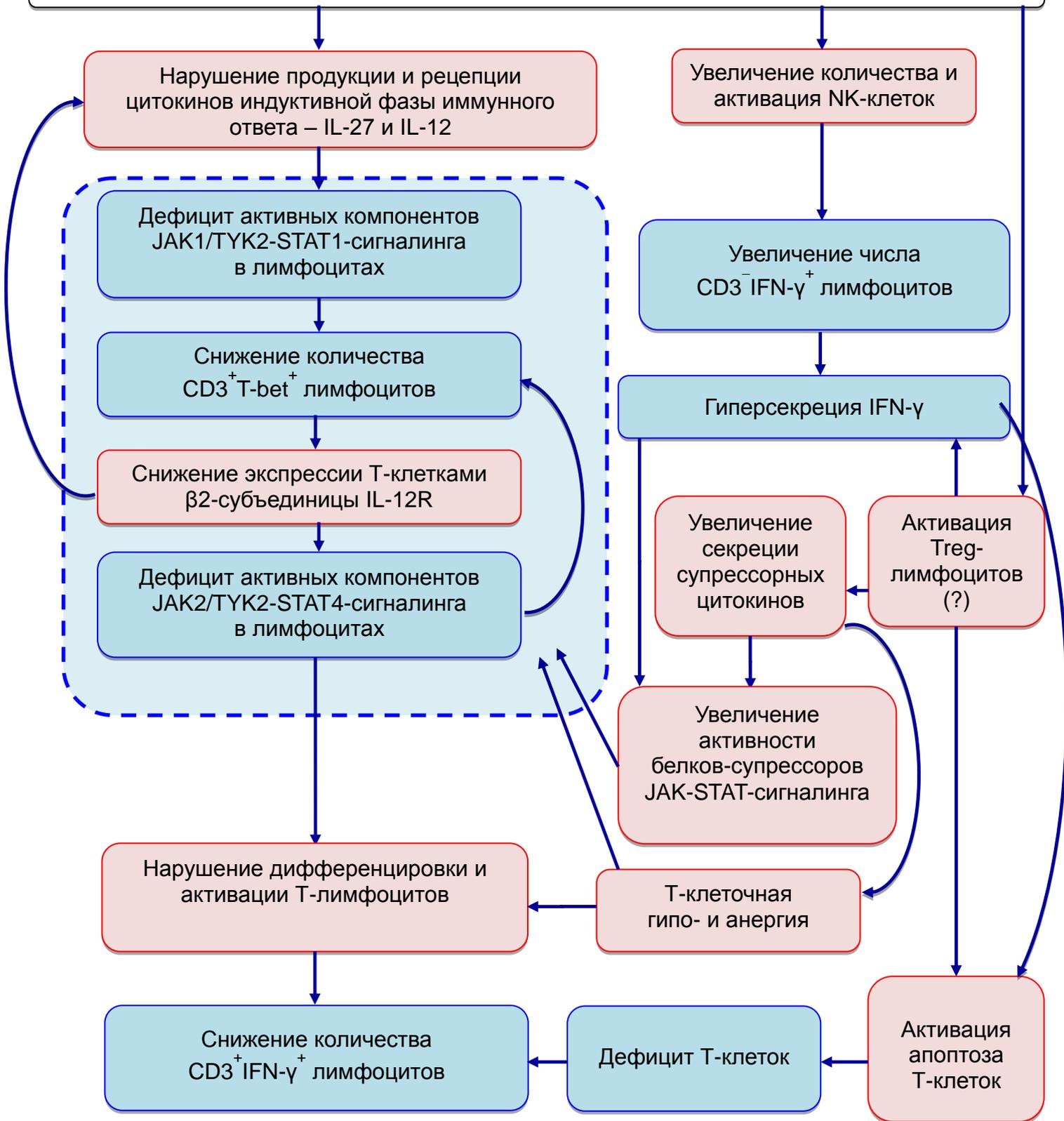


Рисунок 3 – Механизмы нарушений IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов крови при туберкулезе легких по данным литературы и результатам собственных исследований (выделено серым цветом)

## ВЫВОДЫ

1. Нарушение внутриклеточной трансдукции сигнала IL-12/IL-27-индуцированной активации Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких определяется снижением концентрации активных (фосфорилированных) форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лимфоцитах вне зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к препаратам этиотропной терапии с наибольшим дефицитом STAT4 при диссеминированном лекарственно-устойчивом варианте инфекции.
2. Внутриклеточный дефицит активных компонентов JAK1/TYK2-STAT1- и JAK2/TYK2-STAT4-трансдукции сигнала IL-12/IL-27-зависимой индукции Т-лимфоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких опосредует нарушение активации транскрипционного фактора T-bet и дефицит CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> клеток с одновременным увеличением (при инфильтративном лекарственно-устойчивом варианте заболевания) количества T-bet-негативных CD3<sup>+</sup> лимфоцитов.
3. Следствием дисрегуляции механизмов JAK-STAT-опосредованной активации транскрипционного фактора T-bet у больных туберкулезом легких является нарушение дифференцировки IL-12/IL-27-индуцированных *in vitro* Т-лимфоцитов и синтеза ими IFN- $\gamma$ , что проявляется дефицитом CD3<sup>+</sup> клеток с внутриклеточным содержанием цитокина (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>).
4. Угнетение IFN- $\gamma$ -синтезирующей функции Т-клеток у больных туберкулезом легких сочетается с повышением базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  в *in vitro* культуре лимфоцитов крови с наибольшей его выраженностью при диссеминированной форме лекарственно-устойчивого варианта заболевания.
5. Гиперсекреция IFN- $\gamma$  *in vitro* при инфильтративном лекарственно-чувствительном и диссеминированном (вне зависимости от лекарственной чувствительности) туберкулезе легких ассоциирована с увеличением числа CD3-негативных IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> клеток и абсолютной Т-лимфоцитопенией, у больных инфильтративным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких – с соответствующими норме показателями IL-12/IL-27-индуцированного синтеза IFN- $\gamma$  CD3-негативными лимфоцитами и абсолютного содержания Т-клеток в крови.
6. Дефицит CD3<sup>+</sup> клеток и IL-12/IL-27-индуцированных IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и T-bet<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в сочетании с увеличением количества IFN- $\gamma$ -синтезирующих CD3<sup>-</sup> клеток, наиболее выраженный при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких, свидетельствует о нарушении цитокин-зависимой регуляции Th1-иммунного ответа и отсутствии определяющего вклада Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 в гиперсекрецию IFN- $\gamma$  при туберкулезной инфекции.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Продукция интерлейкина-2 лимфоцитами периферической крови у больных туберкулезом легких в условиях CD3/CD28 индукции *in vitro* / А.А. Кошкина, М.С. Писаренко, И.Е. Есимова // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVIII Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2012. – С. 74–76.
2. Писаренко, М.С. Т-клеточные механизмы нарушений индуктивной фазы иммунного ответа при туберкулезе легких / М.С. Писаренко, А.А. Кошкина // Материалы Всероссийской 71-й итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова / СибГМУ; под ред. В.В. Новицкого, Н.В. Рязанцевой. – Томск, 2012. – С. 57–58.
3. Субпопуляционный состав CD3<sup>+</sup> лимфоцитов крови и особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина 2 у больных туберкулезом легких / А.А. Кошкина, М.С. Писаренко, И.Е. Есимова // Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири: материалы X Научно-практической конференции молодых ученых. – Красноярск, 2012. – С. 26–30.
4. Механизмы нарушения JAK/STAT сигнализации в лимфоцитах крови при туберкулезе легких / М.А. Михайлова, М.С. Писаренко // Материалы Всероссийской 72-й итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова / СибГМУ; под ред. В.В. Новицкого, Г.Э. Черногорюка. – Томск, 2013. – С. 217.
5. Секреторная активность Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких / М.В. Игнатов, Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, М.С. Писаренко, П.А. Захарова // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XIX Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2013. – С. 51–52.
6. Содержание активных компонентов JAK-STAT-сигналинга в Т-лимфоцитах крови у больных инфильтративным туберкулезом легких / М.С. Писаренко, И.Е. Есимова, О.И. Уразова // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований: материалы II международной научно-практической конференции. – Москва, 2013. – Т. 3. – С. 44–46.
7. Содержание транскрипционного фактора T-bet в Т-лимфоцитах крови при IL-12/IL-27-индукции *in vitro* у больных инфильтративным туберкулезом легких / М.С. Писаренко, И.Е. Есимова // Многопрофильная больница: проблемы и решения: материалы XVII Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции. – Ленинск-Кузнецкий, 2013. – С. 328–329.
8. Нарушения IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов при диссеминированном туберкулезе легких / М.С. Писаренко, И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, Е.Г. Чурина // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 11. – С. 52–57.
9. Писаренко, М.С. Особенности секреции интерферона-гамма при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / М.С. Писаренко // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9, ч. 3. – С. 444–447.

**СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких  
ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких  
ОКЛ – общее количество лейкоцитов  
ТЛ – туберкулез легких  
IFN – interferon – интерферон  
IL – interleukin – интерлейкин  
JAK – janus kinase – тирозинкиназа семейства Janus  
NK – natural killer – натуральный киллер  
STAT – signal transducer and activator of transcription – трансдуктор (передатчик) сигнала и активатор транскрипции  
Th – T-helper – Т-хелпер  
TYK – tyrosine kinase – тирозинкиназа  
T-bet – T-box expressed in T cells – транскрипционный фактор семейства T-box, экспрессирующийся в Т-клетках  
Treg – regulatory T-lymphocyte – Т-регуляторный лимфоцит