

Научно-квалификационная работа

САНИНА АЛИНА ЕВГЕНЬЕВНА

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В МЕХАНИЗМАХ ПОЛЯРИЗАЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Научные руководители: Уразова Ольга Ивановна, заведующий кафедрой патофизиологии СибГМУ, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН; Серебрякова Валентина Александровна, профессор кафедры фармакологии СибГМУ, доктор медицинских наук, доцент.

Введение. Несмотря на успехи современной медицины в области изучения патогенеза, разработки лекарственных средств и усовершенствование схем лечения, туберкулез легких до сих пор остается одной из наиболее социально значимых проблем здравоохранения. В основе прогрессирующего течения и хронизации патологического процесса при туберкулезе лежит недостаточная эффективность клеточно-эффекторных реакций, обусловленная преобладанием гуморального ответа и супрессорной активностью регуляторных Т-клеток. Критическое значение популяции Treg-лимфоцитов обусловлено их выраженным угнетающим действием на антигенпрезентирующие клетки, дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность Th1-лимфоцитов. Сигнальный путь Notch является важным модулятором дифференцировки Т-клеток и активатором их эффекторных функций. Основная роль в функционировании сигнального каскада принадлежит протеолитическому ферменту γ -секретазе, высвобождающему внутриклеточную часть рецептора – Notch ICD. Домен NICD в комплексе с фактором RBP1 κ активирует транскрипцию генов-мишеней, регулирующих дифференцировку клеток. Одним из известных ингибиторов γ -секретазы является DAPT.

Цель. Оценить роль сигнального пути Notch в механизмах поляризации дифференцировки основных субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов Th1, Th2, Treg при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких.

Задачи.

1. Проанализировать соотношение субпопуляций Th1-, Th2-, Treg- лимфоцитов

крови в суспензионной культуре *in vitro* у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких до и после действия антигенов *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 *in vitro*.

2. Охарактеризовать антиген-индуцированные изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов-хелперов у больных туберкулезом легких при *in vitro* действии специфического ингибитора сигнального пути Notch – DAPT в концентрации 5 и 10 мкМ/л.
3. Дать комплексную оценку влияния сигнального пути Notch на поляризацию дифференцировки Т-лимфоцитов при туберкулезе легких в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя и клинической формы болезни (инфильтративный, диссеминированный).

Материалы и методы. В исследование участвовало 18 больных (средний возраст 45,4±6,58 лет) с впервые выявленным инфильтративным (n=9) и диссеминированным (n=9) туберкулезом легких (ТЛ). Внутри групп пациенты были разделены в зависимости от чувствительности *M. tuberculosis*. Контрольную группу составили 8 здоровых добровольцев. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови методом градиентного центрифугирования. В среду для инкубации вносили антигены *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 в дозе 10 мкг/мл или ингибитор γ -секретазы (DAPT) в дозе 5 и 10 мкМ/л в комбинации с антигенами. Клетки культивировали в полной питательной среде при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч. Содержание Th1-, Th2- и Treg-лимфоцитов оценивали путем определения экспрессии рецептора CD4 и внутриклеточных транскрипционных факторов T-bet, GATA-3, Foxp3 методом проточной цитофлуориметрии. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics 20. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне p<0,05.

Результаты. Установлено, что относительное количество CD4⁺T-bet⁺-, CD4⁺GATA-3⁺- и CD4⁺Foxp3⁺-лимфоцитов у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным (ЛЧ) и лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТЛ превышало их содержание у здоровых добровольцев в среднем в 1,8; 2,5 и 2 раза соответственно (p<0,001).

Увеличение числа Th1-, Th2- и Treg-лимфоцитов после стимуляции

суспензионных культур антигенами *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 регистрировалось во всех группах обследуемых и было более выраженным у больных ТЛ, чем у здоровых доноров.

Сравнение результатов популяционного состава лимфоцитов в зависимости от клинико-патогенетического варианта болезни показало, что в условиях антигенной стимуляции у пациентов с инфильтративным ЛУ ТЛ в культурах клеток преобладали Th1- и Th2-лимфоциты, количество Treg-клеток, напротив, было ниже, чем у больных с сохраненной чувствительностью *M. tuberculosis*. У больных с диссеминированным ЛУ ТЛ регистрировалась обратная зависимость.

Добавление к суспензии клеток ингибитора γ -секретазы (DAPT) в концентрации 5 мкМ/л в комплексе с антигенами CFP10-ESAT6 не сопровождалось статистически значимыми изменениями изучаемых показателей. Добавление в инкубационную среду ингибитора γ -секретазы (DAPT) в концентрации 10 мкМ/л и специфических антигенов CFP10-ESAT6 у больных инфильтративным и диссеминированным ЛЧ и ЛУ ТЛ приводило к статистически значимому повышению количества Th1-лимфоцитов, и напротив, снижению числа Th2- и Treg-клеток по сравнению с соответствующими показателями при стимуляции антигенами.

Подсчет соотношения Th1/Th2-популяций лимфоцитов продемонстрировал статистически значимые различия только в условиях *in vitro* инкубации клеток с антигенами CFP10-ESAT6 и DAPT в концентрации 10 мкМ/л. Во всех группах сравнения подавление сигнального пути Notch приводило к росту соотношения Th1/Th2 относительно аналогичных показателей при антигенной стимуляции.

Выводы.

1. У больных туберкулезом легких *in vitro* стимуляция суспензионной культуры мононуклеарных лейкоцитов крови антигенами *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 сопровождается более выраженным увеличением числа CD4⁺T-bet⁺-, CD4⁺GATA-3⁺- и CD4⁺Foxp3⁺-лимфоцитов, чем у здоровых доноров. При этом соотношение Th1/Th2-лимфоцитов сравнительно с интактной культурой не изменяется.
2. Антиген-специфическая реактивность Th1- и Th2-лимфоцитов у больных диссеминированным туберкулезом легких ниже, а при инфильтративной форме

– напротив, выше при лекарственно-резистентном, чем при лекарственно-чувствительном варианте заболевания. Изменения реактивности Treg-лимфоцитов на антигены *M. tuberculosis* CFP10-ESAT6 проявляются обратной зависимостью.

3. Механизм модулирующего действия ингибитора γ -секретазы (DAPT) в концентрации 10 мкМ/л на Notch-опосредованную дифференцировку Th1-, Th2- и Treg-лимфоцитов у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких обусловлен снижением количества Th2-, Treg-лимфоцитов и увеличением соотношения Th1- и Th2-популяций клеток.
4. *In vitro* увеличение Th1/Th2-соотношения при действии ингибитора DAPT (10 мкМ/л) у пациентов с диссеминированным лекарственно-устойчивым и инфильтративным лекарственно-чувствительным туберкулезом легких достигается за счет угнетения антиген-индуцированной дифференцировки Th2-лимфоцитов, а у больных диссеминированным лекарственно-чувствительным и инфильтративным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких вследствие умножения субпопуляции Th1-клеток и уменьшения доли Th2-лимфоцитов.