

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

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН,  
заслуженный деятель науки России  
В.В. Новицкий

доктор медицинских наук,  
профессор О.И. Уразова

ТОМСК-2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Основные этапы формирования иммунного ответа на <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	10
1.2 Интерферон-гамма как основной лимфоцитарный фактор защиты против <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	14
1.3 Современные представления о функционировании JAK-STAT-сигнальной системы.....	17
1.3.1 Механизмы внутриклеточной JAK-STAT-сигнализации.....	17
1.3.2 Тирозиновые киназы семейства JAK.....	20
1.3.3 Транскрипционные факторы STAT.....	22
1.3.4 Транскрипционный фактор T-bet и его роль в JAK-STAT-сигнальной системе.....	26
1.4 Основные и альтернативные пути секреции IFN- $\gamma$ в иммунном ответе на <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
1.4.1 CD3/TCR-опосредованная и IL-12/IL-27-зависимая секреция IFN- $\gamma$ Th1-лимфоцитами.....	28
1.4.2 Альтернативные пути секреции IFN- $\gamma$ при микобактериальной инвазии.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Объект исследования.....	39
2.2 Материал исследования.....	42
2.3 Методы исследования.....	42
2.3.1 Определение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови.....	42
2.3.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови.....	43
2.3.3 Выделение лимфоцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов методом адгезии к пластику.....	44
2.3.4 Подсчет количества и определение жизнеспособности лимфоцитов в суспензии.....	44
2.3.5 Специфическая индукция Т-лимфоцитов.....	45

2.3.6	Приготовление лизатов лимфоцитов периферической крови.....	47
2.3.7	Определение содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 в лизатах лимфоцитов.....	48
2.3.8	Определение содержания активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов.....	49
2.3.9	Определение внутриклеточного IFN- $\gamma$ и активной формы транскрипционного фактора T-bet в лимфоцитах периферической крови методом двухцветной проточной цитофлуориметрии.....	50
2.3.10	Исследование базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$ лимфоцитами крови методом иммуноферментного анализа .....	53
2.4	Статистический анализ результатов.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		55
3.1	Общее количество лейкоцитов и содержание лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких.....	55
3.2	Содержание T-лимфоцитов в крови у больных туберкулёзом лёгких.....	57
3.3	Содержание активных форм факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких.....	58
3.4	Содержание активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2 и TYK2 в лизатах IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких.....	59
3.5	Количество IL-12/IL-27-индуцированных T-лимфоцитов крови, содержащих транскрипционный фактор T-bet, у больных туберкулезом легких.....	60
3.6	Количество IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови с внутриклеточным содержанием IFN- $\gamma$ у больных туберкулёзом лёгких.....	63
3.7	Уровень секреции IFN- $\gamma$ в культуре IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких.....	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....		71
ВЫВОДЫ.....		87
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....		89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		91

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** 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 [69, 94, 125].

Являясь примером инфекции с внутриклеточным типом паразитирования возбудителя, туберкулез характеризуется, прежде всего, дисрегуляцией иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитами-хелперами типа 1 (Th1) [9, 24, 27, 215]. 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 NK-клеток, и оказывает, в целом, регуляторное влияние на формирование клеточного иммунитета [10, 14, 101, 110, 181, 213].

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 причинной 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 [27, 47, 78, 158, 238]. 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, секретируемые активированными макрофагами и дендритными клетками (DC) [38, 127, 130, 154, 207]. 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 [1, 38, 50, 127, 144, 177, 185, 190, 195]. 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.** 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 противoinфекционного 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 IL-12/IL-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 IL-12/IL-27-опосредованной активации Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.

**Научная новизна исследования.** Впервые проведено комплексное исследование нарушений ключевых этапов IL-12/IL-27-опосредованной сигнальной трансдукции в Т-лимфоцитах периферической крови при различных клинико-патогенетических вариантах туберкулеза легких (ТЛ). Показано, что при ТЛ *in vitro* гиперсекреция (базальная и IL-12/IL-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 IL-12/IL-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 T-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-поляризирующей) *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> T-клеток.
4. Проявления нарушений JAK-STAT-опосредованной активации T-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 клиничко-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.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 2 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 7 статей и тезисов в материалах конференций, конгрессов и съездов.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 9 таблицами. Библиографический список включает 239 наименований, из них 101 отечественных и 138 зарубежных источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Основные этапы формирования иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis*

Известно, что иммунная система одной из первых реагирует на воздействие угрожающих организму факторов природной среды. Туберкулез – инфекция с внутриклеточным паразитированием микобактерий, что делает их защищенными от действия специфических антител и системы комплемента, а резистентность к антимикробным факторам клеток макрофагального ряда позволяет им выживать и размножаться внутри этих клеток. В связи с этим, решающим моментом в формировании эффективной защиты против *M. tuberculosis* является запуск клеточно-опосредованного иммунного ответа с активацией наивных Т-лимфоцитов (Th0) в направлении хелперных клонов типа 1 (Th1). Для того чтобы ликвидировать внутриклеточную инфекцию, обусловленную *M. tuberculosis*, иммунная система должна распознать и уничтожить инфицированные клетки вместе с находящимся в них патогеном. В данной ситуации ключевую роль в формировании эффективной реакции на инфекцию играют альвеолярные макрофаги, дендритные клетки (DC) и Т-лимфоциты. При этом от степени активации данных клеток напрямую зависит качество формируемого иммунного ответа [3, 11, 29, 64, 69, 70, 71, 91, 101, 181, 213].

Первым этапом формирования иммунного ответа на *M. tuberculosis* является активация антигенпрезентирующих клеток (APC). Процесс активации макрофагов и DC начинается с захвата ими возбудителя туберкулеза [24, 98, 190, 213, 215, 221]. Исход взаимодействия APC и микобактерий туберкулеза зависит от баланса антимикробной активности фагоцитирующих клеток и устойчивости микобактерий к их бактерицидному действию. При функциональной недостаточности APC возбудитель инфекции способен покоиться и активно размножаться в них [13, 15, 57, 235]. В случае же функциональной состоятельности APC индукция Th1-иммунного ответа начинается с первичного распознавания клеткой патоген-ассоциированных молекулярных паттернов *M. tuberculosis* с помощью молекулярных структур на клеточной поверхности, названных Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors, TLR). Активация TLR приводит к их олигомеризации и способности связывать несколько

внутриклеточных адаптерных белков (MyD88, TRAF6 и др.), обеспечивающих дальнейшую передачу сигнала активации и имеющих сайт специфического связывания с активированными Toll-подобными рецепторами [4, 89, 124, 141, 142, 167, 213, 215, 226, 235]. Стимуляция TLR запускает серию фосфорилирования/дефосфорилирования большого числа протеинкиназ, которые влияют на активность факторов транскрипции NFAT (nuclear factor of activated T-cells) и AP-1 (activator protein 1), освобождают ядерный фактор транскрипции NF-κB (nuclear factor κB) от их ингибирующего влияния [85, 124]. Активированные NF-κB, AP-1 и NFAT запускают транскрипцию генов, кодирующих провоспалительные цитокины и хемокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF-α), интерлейкин (IL)-12, IL-27, IL-18, IL-2, IL-1β и др., а также стимулируют экспрессию на APC молекул главного комплекса гистосовместимости второго класса (MHC II) и костимулирующих молекул CD80 и CD86, без которых невозможна презентация антигена Т-лимфоциту-хелперу и передача ему сигнала об антигене через Т-клеточный рецептор. Наряду с этим, в фаголизисах APC происходит расщепление и переработка захваченного антигена, соединение антигенных детерминант с молекулами MHC II и презентация антигена [129, 174, 176, 180, 231].

Второй этап формирования иммунного ответа на *M. tuberculosis* является ключевым в противотуберкулезной защите. Он связан с активацией наивных CD4<sup>+</sup> Th0-клеток, дифференцировкой и пролиферацией Th1-лимфоцитов. Именно от активности Th1-лимфоцитов зависит ответная, через секрецию Th1-цитокинов, активация макрофагов и цитотоксических лимфоцитов (CTL), что определяет протекание иммунного ответа по типу гиперчувствительности замедленного типа [41, 46, 57, 82, 83, 97, 121, 124, 127, 196].

Процесс активации наивных Т-клеток достаточно сложный, осуществляется непосредственно путем взаимодействия MHC-пептидного комплекса APC с Т-клеточным рецептором на лимфоцитах (контактный или рецептор-опосредованный путь активации) и дополняется опосредованно через изменение продукции и связывание цитокинов (дистанционный или цитокин-опосредованный путь активации) [98]. Оба пути являются взаимодополняющими и на начальных этапах активации Т-лимфоцитов могут заменять друг друга. Однако следует отметить, что главным эффектом рецептор-опосредованного пути, опосредующего передачу информации об антигене, является продукция IL-2 – основного аутокринного ростового фактора пролиферации и

дифференцировки Т-клеток. Важным эффектом цитокин-опосредованной активации становится синтез и секреция Th1-лимфоцитарного интерферона (IFN)  $\gamma$  – важного регулятора активности иммунокомпетентных клеток и, в первую очередь, клеток макрофагального звена.

Рецептор-опосредованная передача активационного импульса начинается с контактного взаимодействия Т-клеточного рецептора (CD3/TCR) Т-лимфоцита при участии его корецептора CD4 с МНС-пептидным комплексом на поверхности APC. Данная связь обеспечивает первый активационный сигнал. Второй активационный сигнал обеспечивается взаимодействием костимулирующих молекул CD80/CD86 (B7-1/B7-2) на APC с молекулой CD28 на Т-клетках и является крайне необходимым, «разрешающим» активацию Т-лимфоцитов [101]. Оба сигнала запускают серию каскадных реакций с активацией в Т-клетке транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT, обеспечивающих, в конечном итоге, транскрипцию гена IL-2 (*IL2*) и его рецептора [9, 14, 101, 102, 183]. Экспрессия IL-2-рецептора (IL-2R) на Т-лимфоците и секреция IL-2 позволяет клетке перейти в режим регулирования процессов активации, пролиферации и дифференцировки в клетки-эффекторы других Т- и/или В-лимфоцитов, обеспечивая их клональную экспансию в ответ на антигенспецифическую стимуляцию, синтез ими цитокинов и антител [19, 46, 82, 130]. Другими словами, данный путь активации приводит к наработке антигенспецифичных клонов лимфоцитов, направленных на элиминацию конкретного патогена.

Цитокин-опосредованный путь активации Т-лимфоцитов, применительно к туберкулезной инфекции, обеспечивает дополнительную индукцию Th1-дифференцировки посредством продуцируемых APC цитокинов семейства IL-12 (IL-12, IL-27). Секреция IL-12 и IL-27 APC происходит в ответ на прямое раздражение продуктами микробного происхождения. Установлено, что под влиянием интерлейкинов семейства IL-12 происходит дифференцировка Т-лимфоцитов, повышается их цитотоксическая активность, усиливается пролиферация Т-лимфоцитов, CTL и натуральных киллеров (NK). Цитокин-активированные Th1-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности рецепторы к IL-18 и IFN- $\gamma$  (CD119), начинают продуцировать лимфоцитарный IFN- $\gamma$  – главный антимикобактериальный фактор [46, 82, 127, 130, 168, 207, 236]. Секреция IFN- $\gamma$  обеспечивается запуском сигнальных путей JAK-STAT, о которых более подробно будет описано ниже (см. п. 1.3, стр. 17).

Далее наступает третий этап формирования иммунного ответа – эффекторная стадия, в основе которого лежит активация киллерной функции CTL, NK, моноцитов/макрофагов и гранулоцитов. Так, продуцируемый активированными Th1-лимфоцитами и NK-клетками IFN- $\gamma$  путем паракринной регуляции способствует дополнительной активации макрофагов, в результате чего возрастает их микробицидная, фагоцитарная, антигенпрезентирующая и секреторная активность [19, 110, 135, 199, 221]. В свою очередь, стимулированная под влиянием Th1-лимфоцитарного IFN- $\gamma$  секреция IL-12 и IL-18 APC, действующих как синергисты, обеспечивает наработку необходимых объемов IFN- $\gamma$  Th1-клетками. При этом в основе регуляции интерферогенеза лежат как положительная, так и отрицательная обратная связь, характеризующаяся способностью IFN- $\gamma$  индуцировать синтез супрессоров JAK-STAT-сигнального пути [1, 135, 202, 210].

Кроме того, совместное действие IL-12, IL-2 и IFN- $\gamma$  на CD8-позитивные T-клетки приводит к усилению пролиферации, дифференцировки и созреванию CTL, токсическая функция которых реализуется в результате контактного взаимодействия с инфицированными клетками-мишенями. Такая реакция не обеспечивает полную защиту от микобактерий туберкулеза, но ограничивает распространение инфекции [24, 27, 45, 190]. Инфицированные *M. tuberculosis* клетки (в том числе макрофаги) уничтожаются CTL посредством прямого перфорин-гранзимового механизма. Перфорин, синтезируемый в гранулах CD8<sup>+</sup> CTL, «продырявливает» мембрану клетки-мишени. Через возникшие поры внутрь атакуемой клетки проникают токсические пептиды – гранзимы, которые запускают процесс ее апоптоза. Секретируемые CTL TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  также оказывают стимулирующее влияние на макрофаги [27, 91, 98, 100, 221].

Таким образом, течение туберкулеза легких характеризуется множеством иммунологических реакций, целью которых является уничтожение и элиминация патогена. В ходе этих реакций участвует огромное количество иммунных клеток различных популяций, рецепторных молекул и корецепторов, медиаторов и цитокинов, важность которых неоспорима как на начальных, так и на более поздних этапах иммунного ответа против *M. tuberculosis*. Одной из задач совместной работы всех компонентов межклеточной кооперации является наработка, поддержание и контроль ключевых факторов протективного иммунитета для борьбы с туберкулезной инфекцией – IL-2 (основной аутокринный ростовой фактор и активатор T-лимфоцитов) и IFN- $\gamma$ ,

напрямую и опосредованно оказывающего губительное действие на *M. tuberculosis* [14, 24, 26, 82, 83, 101, 215].

## **1.2 Интерферон-гамма как основной лимфоцитарный фактор защиты против *Mycobacterium tuberculosis***

IFN- $\gamma$  впервые был обнаружен в культуральной среде лейкоцитов, активированных антигеном, как фактор, обладающий антивирусной активностью. Лишь позднее было показано, что участие в противовирусной защите не является главным свойством этого цитокина. Участие в важнейших иммунологических реакциях позволило ему получить название «иммунный интерферон» [38, 44, 166, 237].

На сегодняшний день IFN- $\gamma$  является одним из основных медиаторов межклеточных взаимодействий, участвующих в поддержании гомеостаза как в норме, так и при различных патологических процессах, в том числе при туберкулезе. Показано, что недостаточная продукция IFN- $\gamma$  ведет к неспособности организма контролировать размножение внутриклеточных патогенов. Так, иммунная система мышей, нокаутных по генам и рецептору IFN- $\gamma$ , формируется без значимых отклонений до тех пор, пока не произойдет контакт с инфектогеном. При экспериментальном инфицировании таких мышей вакцинным штаммом *M. bovis* на фоне искусственно созданных генетических дефектов животные не могли контролировать размножение микобактерий и быстро погибали от генерализованной туберкулезной инфекции [191, 194]. Исследованиями последнего десятилетия продемонстрировано также, что низкая продукция IFN- $\gamma$  ассоциирована с тканевым некрозом и фатальным течением туберкулеза [79, 80, 209].

IFN- $\gamma$  продуцируется NK, CTL и, главным образом, зрелыми Th1-лимфоцитами, именно поэтому он считается ключевым цитокином клеточно-опосредованного механизма иммунной системы в ответ на внедрение *M. tuberculosis* [1, 110, 124, 135].

Главной функцией IFN- $\gamma$  является активация макрофагов, повышение их ферментативной и общей бактерицидной активности. Активированные макрофаги способны усиленно генерировать агрессивные формы кислорода, что сопровождается так называемым «кислородным взрывом», воздействующим на фагоцитированный возбудитель туберкулеза. Кроме того, под влиянием IFN- $\gamma$  происходит усиление активности лизосомальных ферментов и значительное ослабление свойства *M.*

*tuberculosis* препятствовать образованию фаголизосомы, что способствует благополучному протеканию завершающей стадии фагоцитоза, направленной на разрушение и переваривание возбудителя. Под влиянием IFN- $\gamma$  каждое последующее поколение макрофагов и DC, вступающее во взаимодействие с туберкулезным возбудителем, становится все более иммунокомпетентным [19, 27, 60, 67, 79, 87, 98, 99, 157].

Важное значение IFN- $\gamma$  связано также с его способностью стимулировать экспрессию молекул MHC I, MHC II и CD80/CD86 на макрофагах и DC, необходимых для более эффективного представления антигенов Т-лимфоцитам. При этом IFN- $\gamma$  индуцирует экспрессию молекул MHC I, MHC II даже на тех клетках, которые не экспрессируют их конституционно [19, 67, 99, 110, 221].

Активированные под действием IFN- $\gamma$  макрофаги усиленно секретируют провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-12, IL-18, IL-27, TNF- $\alpha$ , которые по ауто- и паракринному механизму усиливают активность клеток-продуцентов. Так, TNF- $\alpha$ , оказывая аутокринное действие на макрофаги и NK-клетки, стимулирует их выход из кровеносного русла в ткани, где развивается иммунное воспаление [17, 41, 97, 100, 113, 121, 229].

IFN- $\gamma$  необходим для созревания Т-киллеров (CD8<sup>+</sup>-клеток, CTL) посредством увеличения численности на их поверхности рецепторов к IL-2 и антигенов MHC класса II. В результате происходит активация как цитотоксической, так и антигенпрезентирующей активности Т-лимфоцитов [101]. IFN- $\gamma$  способствует усилению активности NK-клеток, однако его влияние на NK-лимфоциты не связано с повышением экспрессии на их поверхности MHC-антигенов, которое имеет место при индукции макрофагов или цитотоксических Т-лимфоцитов. Полагают, что молекулярные механизмы регуляции цитотоксической активности NK-лимфоцитов, опосредованные влиянием IFN- $\gamma$ , связаны с увеличением экспрессии на их поверхности рецепторов к IL-2 [189].

Под действием IFN- $\gamma$  ингибируется продукция IL-4 и IL-10, являющихся его антагонистами, что способствует активации дифференцировки Т-клеток в Т-хелперы типа 1 при подавлении образования Th2-лимфоцитов [101]. Кроме того, IFN- $\gamma$  является индуктором апоптоза дифференцированных В-клеток, дающих начало аутореактивным клонам, активирует продукцию белков острой фазы воспаления, усиливает экспрессию

генов компонентов C2 и C4 системы комплемента и блокирует синтез трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ответственного за развитие фиброза легких [101].

К эффектам IFN- $\gamma$  следует отнести и его способность стимулировать продукцию иммуноглобулинов (Ig) IgG2a и IgG3 В-лимфоцитами с одновременным подавлением синтеза IgG1 и IgE, что, видимо, является проявлением негативной регуляции иммунологических реакций, активируемых основным цитокином Th2 – IL-4 – тем самым, сдвигая баланс в сторону активации клеточного иммунитета [38, 101, 166]. Полагают, что формирование опсонизирующих антител IgG2a к полисахаридным компонентам *M. tuberculosis* способствует склеиванию бактерий, облегчая последующий их фагоцитоз через FcR- и CR1-рецепторы фагоцитирующих клеток. Кроме того, данные антитела, свободно находящиеся в крови, способны самостоятельно блокировать *M. tuberculosis*, образуя с ними комплекс «антиген-антитело» [27].

Имеются сведения о способности IFN- $\gamma$  контролировать гиперактивацию клеточного иммунитета с участием Т-регуляторных лимфоцитов (Treg). Синтезированный активированными Treg-клетками IFN- $\gamma$  подавляет пролиферацию Т-хелперов типа 1, экспрессирующих IFN- $\gamma$ , за счет изменения активности NO-синтазы, индолеамин-2,3-диоксигеназы (IDO) и некоторых других ферментов в APC [238].

Установлено, что ген *IFNG* расположен в 12-й хромосоме. Молекулярная масса мономера IFN- $\gamma$  составляет 18 кДа. В зависимости от степени гликозилирования молекула может изменять массу на 20 и 25 кДа. Дисульфидные связи в составе молекулы IFN- $\gamma$  отсутствуют. Активная форма IFN- $\gamma$  представлена в виде димера. В структуре IFN- $\gamma$  преобладают  $\alpha$ -спиральные участки (6  $\alpha$ -спиралей) [38, 44, 48, 98, 166].

Рецептор IFN- $\gamma$  принадлежит к семейству интерфероновых рецепторов. Он имеет две  $\alpha$ - (IFNGR1, или CD119, кодируется в хромосоме 6) и две  $\beta$  (IFNGR2, кодируется в хромосоме 21) цепи. При этом именно субъединица IFNGR1 является непосредственным лиганд-связывающим рецептором, а субъединица IFNGR2 выполняет функцию вспомогательного белка, ассоциированного с внутриклеточными тирозиновыми киназами семейства JANUS. Молекула IFN- $\gamma$  реагирует с двумя  $\alpha$ -цепями, не взаимодействующими между собой, что приводит к быстрой их димеризации и формированию сайта распознавания для IFNGR2 с последующим присоединением двух  $\beta$ -цепей рецептора. Лиганд-индуцированная сборка полного рецепторного



комплекса содержит две IFNGR1 и две IFNGR2 субъединицы, внутриклеточные домены которых оказываются, благодаря этому, в тесном взаимодействии с тирозиновыми киназами JAK1 и JAK2. В результате образуется активный многомерный комплекс, способный к передаче стимулирующего сигнала внутрь клетки [1, 101, 157].

После взаимодействия IFN- $\gamma$  с клеточным рецептором происходит поглощение (эндоцитоз) интерферона клеткой с последующей деградацией как самого IFN- $\gamma$ , так и его рецептора. При этом показано, что экспрессия новых рецепторных субъединиц на моноцитарно-макрофагальных клетках находится в прямой зависимости от числа деградированных молекул, что означает достаточно быстрое восстановление на поверхности данных клеток определенной константы аффинитета и молекулярного веса IFNGR1 и IFNGR2. Для Т-лимфоцитов время восстановления рецепторов к IFN- $\gamma$  значительно затягивается, что имеет определенный биологический смысл. Так, снижение количества рецепторов позволяет Т-клеткам секретировать IFN- $\gamma$ , не опасаясь его последующего повторного связывания с Т-лимфоцитами, а сниженная способность к восстановлению рецепторных субъединиц позволяет данному виду клеток пролиферировать в процессе развития иммунного ответа [1, 101, 157].

Учитывая всю важность Th1-лимфоцитарного IFN- $\gamma$  для контроля над развивающейся инфекцией, необходимо отметить, что лишь в адекватных количествах он способен выполнять специфические функции по ограничению размножения и роста микобактерий в организме. Другими словами, IFN- $\gamma$  не должно быть мало и не должно быть много. Недостаточность или избыток цитокина может стать причиной неэффективности иммунного ответа на *M. tuberculosis*. Однако, имеющиеся в научной литературе данные, характеризующие секрецию IFN- $\gamma$  при туберкулезной инфекции, носят противоречивый характер. В одних случаях регистрируется его повышенная продукция, в других – недостаточность. Чем обусловлена такая разница в представленных результатах и каковы молекулярные механизмы нарушения IFN- $\gamma$ -продукции – вопрос, который требует дальнейшего и более детального исследования.

### **1.3 Современные представления о функционировании JAK-STAT-сигнальной системы**

#### **1.3.1 Механизмы внутриклеточной JAK-STAT-сигнализации**

Наиболее сложные механизмы приобретения клеткой функциональной автономии заключаются в изменениях компонентов цитоплазматических путей сигнальной трансдукции, которые получают и процессируют сигналы, генерируемые посредством лиганд-активированных рецепторов и ростовых факторов. Изменение состояния клетки в ответ на внешние сигналы управляется генетическим аппаратом, находящимся в ядре. Внутриклеточный барьер в виде ядерной мембраны защищает ДНК от действия протеолитических ферментов, но в то же время ограничивает возможности ядерных генов непосредственно улавливать изменения вне- и внутриклеточной среды и реагировать на них. Средовые сигналы в форме цитокинов и других протеинов попадают в клетку с помощью двух основных механизмов. Некоторые средовые агенты передают в клетку специфический сигнал, непосредственно мигрируя через плазматическую мембрану в цитоплазму и связываясь там со своими белками-мишенями или рецепторными молекулами. Затем такие лиганд-рецепторные комплексы транслоцируют свои лиганды прямо в ядро. Но чаще сигнальная трансдукция происходит по альтернативному механизму [38, 59, 116].

В последнее десятилетие появляется множество новых сведений об абсолютно неизвестной до этого времени сигнальной системе, которая у животных и человека трансдуцирует множество цитокиновых сигналов и ростовых факторов, обеспечивающих клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз. Такой принципиально важной является сигнальная JAK-STAT-система (система «janus kinases – signal transducers and activators of transcription»). Интересно, что этот сигнальный путь универсален практически для всех живых организмов и является эволюционно древним и достаточно консервативным, что подтверждается общностью структуры и функционирования всех ее представителей как у беспозвоночных, так и у позвоночных. На сегодняшний день можно с уверенностью утверждать доказанность ее ключевой роли, в частности, в развитии и становлении человеческого и животного организма, отдельных популяций клеток, в иммунных механизмах и процессах адаптации. Как видно, принципиальная важность JAK-STAT-сигнализации определяется ее ролью в самых разнообразных процессах организма. В связи с этим, отсутствие или избыточная активация любого ее звена может приводить к серьезным негативным последствиям [40, 50, 52, 53, 122].

Доказано, что компоненты JAK-STAT-сигнальной трансдукции дискретно

локализуются в клетке и это определяет специфичность фосфорилирования. Сигнальные компоненты сложно организованы в дискретные сигнальные комплексы как на плазматической мембране, так и в цитоплазме и ядре. Сигналы канализируются специфическими путями от мембраны к ядру, и за трансляцию сигнала ответственны специальные клеточные компартменты. Этим обеспечиваются эффективность и специфичность сигнальной трансдукции. Неслучайная локализация сигнальных белков является фундаментальным принципом внутриклеточного сигналинга, и пространственное разделение белков широко используется как механизм предотвращения их спонтанной активации. Локальное перемещение белковых молекул происходит при индуцибельной мембранной ассоциации цитоплазматических белков с фосфотирозин-связывающими доменами, при активации сигнальных белков в клетке и при транслокации их в ядро и из ядра [59, 116].

JAK-STAT-сигнальная система представляет собой особый вид передачи информации через трансмембранные рецепторы непосредственно к промоторам генов-мишеней в ядре без участия вторичных мессенджеров. Она включает в себя два основных компонента – нерцепторные тирозиновые киназы семейства JANUS (JAK) и сигнальный белок-трансдуктор и активатор транскрипции STAT (signal transducer and activator of transcription) [2, 50, 147, 201], а также регуляторные элементы – белки-супрессоры цитокиновой сигнализации (SOCS), протеиновые тирозинфосфатазы (PTP), транскрипционные репрессоры (PIAS), осуществляющие модификацию и деградацию компонентов JAK-STAT-сигнальной системы [51, 192, 202].

Связывание цитокинов с рецепторами приводит к запуску сигнализации посредством гомо- или гетеродимеризации субъединиц рецептора, которые устанавливаются напротив JAK. При гетеродимеризации рецепторов (большинство рецепторов к интерлейкинам и интерферонам) встречается также гетеродимеризация различных JAK, которые при этом активируют друг друга. Фосфорилирование рецептор-ассоциированных янус-киназ приводит к повышению их каталитической активности. После собственной активации и фосфорилирования Янус-киназы фосфорилируют по тирозиновым остаткам внутриклеточные субъединицы рецептора, давая в последующем возможность связывания в этих участках белков STAT с SH2 или тирозин-связывающим доменом. Эти белки затем фосфорилируются с помощью Янус-киназ. Согласно существующим данным, активация белков STAT подразумевает их

фосфорилирование по тирозиновым и сериновым остаткам в С-концевой части молекул, димеризацию молекул по SH2-доменам, транслокацию димеров в ядро и их связывание с ДНК [2, 12, 86, 138, 149, 184, 195, 201] (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Базовая схема активации сигналинга JAK-STAT в лимфоцитах

### 1.3.2 Тирозиновые киназы семейства JAK

Семейство Янус-киназ в клетках млекопитающих, в противоположность другим семействам киназ, является малочисленным и представлено только четырьмя JAK-белками: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 [36, 40, 50, 52, 177, 195, 214]. После открытия этой уникальной сигнальной системы для определения биологической функции каждой JAK были созданы и исследованы JAK-дефицитные генетические линии мышей. Так, JAK1-нокаутные мыши погибали перинатально вследствие тяжелого неврологического дефекта, связанного, по-видимому, с неспособностью передачи сигналов через некоторые цитокины (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15). JAK2-дефицит способствовал эмбриональной гибели животных, обусловленной отсутствием эритропоэза вследствие неспособности отвечать на IL-3, IFN- $\gamma$ , эритропоэтин, тромбопоэтин и GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов). JAK3-дефицит проявлялся в отсутствии ответа на IL-2, IL-4, IL-7, усилении T-клеточного апоптоза, блоке дифференцировки B-лимфоцитов на пре-B-клеточной стадии. Парадокс JAK3-дефицита заключался в экспрессии на T-лимфоцитах достаточных количеств

активационных и адгезивных молекул (CD3, CD4, CD28-молекул), но практически полного отсутствия рецептора TCR, который абсолютно необходим Т-лимфоцитам для осуществления полноценного контакта с APC. ТУК2-нокаутные мыши проявляли дефект в передаче интерфероновых сигналов [122, 147, 149, 195, 201, 239].

Семь гомологичных участков фермента (JAK homology regions, JHs) включают в себя различные по строению и функциям домены. Все члены семейства JAK имеют активный С-концевой тирозинкиназный домен JH1 и сходный по строению домен JH2, энзиматически неактивный псевдокиназный домен, осуществляющий функцию подавления активности киназы. Другая не менее важная функция псевдокиназного домена заключается в формировании мест связывания для STAT-белков с клеточными рецепторами. Наличие двух сходных по строению, но противоположных по функции доменов в одной тирозинкиназе напоминает римского бога – двуликого Януса с двумя лицами, смотрящими в противоположные стороны, т.е. в двух направлениях. Это послужило поводом для обозначения этих тирозинкиназ как Янус-киназ. JH1- и JH2-домены составляют так называемую «петлю активации» фермента. Аминотерминальный или FERM (JH5, JH6, JH7) домен обеспечивает связывание киназы и трансмембранных цитокиновых рецепторов и регулирует киназную активность фермента. Кроме того, имеется промежуточный SH2 (JH3 и JH4) домен, точная функция которого до сих пор неизвестна [50, 59, 147, 171, 184, 214, 239]. Трехмерная пространственная структура Янус-киназ до настоящего времени малоизучена. Они представляют собой сравнительно большие киназы, состоящие более чем из 1100 аминокислотных остатков с молекулярной массой 120-140 кДа [44, 239].

Известно, что JAK1, JAK2 и ТУК2 экспрессированы в различных тканях и активируются множеством цитокинов. Это связано, вероятнее всего, с тем, что для передачи сигнала от конкретного цитокина часто требуется одновременное участие нескольких JAK. Так, например, IFN- $\alpha/\beta$ -сигнализация требует одномоментного участия JAK1 и ТУК2. При этом  $\alpha$ -субъединица IFN- $\alpha/\beta$ -рецептора связывается с ТУК2, в то время как  $\beta$ -субъединица – с JAK1. В противоположность, IFN- $\gamma$  активирует JAK1 и JAK2:  $\alpha$ -субъединица IFN- $\gamma$ -рецептора связывается только с JAK1, а  $\beta$ -субъединица – только с JAK2. Помимо рецепторов IFN, упомянутые янус-киназы ассоциированы с рецепторами, которые используют gp130,  $\beta$ - (gp140) и  $\gamma$ -цепи [147, 149, 171, 195].

JAK3, в отличие от практически повсеместно экспрессированных JAK1, JAK2 и

ТУК2, является специфичной для определенных тканей. Она конститутивно экспрессирована в натуральных киллерах и тимоцитах и индуцибельно – в Т- и В-лимфоцитах, миелоидных клетках. JAK3 активируется только теми цитокинами, рецепторы к которым имеют  $\gamma$ -цепь (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21). Это объясняется тем, что JAK3 специфично ассоциирован с  $\gamma$ -цепью [50, 147, 149, 195]. Показано, что мутация  $\gamma$ -цепи или JAK3 вызывает тяжелый комбинированный иммунодефицитный синдром (severe combined immune deficiency, SCID), характеризующийся дефицитом или полным отсутствием Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток, что связано, вероятно, с невозможностью передачи сигналов от цитокинов. SCID часто оказывается фатальным в течение первого года жизни, несмотря на проведение трансплантации стволовых клеток [122, 131, 149, 178].

Таким образом, Янус-киназы являются неотъемлемыми и крайне важными участниками внутриклеточного сигналинга в Т-лимфоцитах, однако особенности их функционирования при патологических процессах, в том числе и при туберкулезной инфекции, изучены недостаточно, а имеющиеся в научной литературе данные носят фрагментарный и неупорядоченный характер, что оставляет предпосылки к активному изучению данного семейства киназ.

### 1.3.3 Транскрипционные факторы STAT

Транскрипционные факторы – это белки, которые обычно формируются в процессе передачи активационных и других индукторных сигналов и вызывают экспрессию генов, взаимодействуя с ДНК в их промоторной области или действуя на эпигенетическом уровне [2, 102, 217].

Ж.Е. Darnell и коллеги, занимаясь очисткой факторов, связанных с промоторами IFN-индуцибельных генов, впервые выделили первого представителя семейства STAT-белков. Полученный IFN- $\alpha$ -индуцированный комплекс состоял из полипептида с молекулярной массой 91 кДа, позднее определенный как STAT1, белка с молекулярной массой 113 кДа – STAT2 и p48, представителя семейства IFN-регулируемых факторов. IFN- $\gamma$ -индуцированный комплекс, или  $\gamma$ -активированный фактор (GAF), как было показано, состоял только из двух молекул STAT1. Вслед за STAT1 и STAT2 были выделены остальные представители данного семейства [136]. Важно отметить, что

белки семейства STAT являются транскрипционными регуляторами дифференцировки – это разновидность транскрипционных факторов, которые не только вызывают экспрессию определенных генов, но и стабилизируют паттерны экспрессированных и доступных для индукции генов, т.е. вызывают дифференцировку клеток [22, 50, 102, 109].

У млекопитающих семейство STAT включает 7 представителей: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B и STAT6. Эти транскрипционные факторы были объединены в новое семейство, отличительными чертами которого считается наличие SH2-доменов и способность к фосфорилированию входящего в их состав тирозина. Тогда же был описан принцип функционирования сигнального пути, представителями которого они являлись. STAT-белки находятся в цитоплазме в неактивном состоянии. После связывания цитокина с рецептором, рецептор-ассоциированные тирозиновые JAK-киназы трансактивируются и индуцируют активность STAT, создавая участок связывания для STAT-белков, которые при этом димеризуются. Активированные STAT-димеры покидают рецептор, транслоцируются в ядро, где активируют транскрипцию [12, 36, 40, 59, 106, 116, 214].

В противоположность Янус-киназам, молекулярная структура STAT достаточно хорошо изучена, и, в целом, похожа на структуру других транскрипционных факторов. Большинство STAT-белков состоят из 750 аминокислотных остатков и только STAT2 и STAT6 состоят из 850 аминокислотных остатков. Димерная молекула STAT формирует С-петлеобразную структуру вокруг матричной ДНК, но в отличие от остальных ядерных факторов у STAT-белков меньше непосредственно контактирующих с ДНК мест связывания [40].

В состав молекулы STAT, также как и молекулы JAK, включены специфические домены, выполняющие строго определенные функции. Так, консервативный N-концевой домен (amino-terminal domain) отвечает за межбелковые димер-димерные взаимодействия между двумя STAT-димерами с образованием слабых связей, что, по-видимому, может играть роль в достижении еще большей специфичности сигнальных путей. За ним следует спирально скрученный домен (coiled-coil domain), который также важен для межбелковых взаимодействий. Установлено, в частности, что коактиваторы p48 и p300/CBP взаимодействуют со STAT именно через этот домен [1, 50, 58,]. В центральной части молекулы STAT находится ДНК-связывающий домен (DNA-binding

domain), который содержит несколько аминокислотных остатков, консервативных для всего STAT-семейства. С-петлеобразная структура вокруг матричной ДНК поддерживается благодаря взаимодействию фосфотирозин-SH2-доменов. SH2-домен – компактный глобулярный домен, взаимодействующий с белками, содержащими фосфорилированный остаток тирозина в определенной аминокислотной последовательности. Его функцией является обеспечение правильной ориентации субстрат-связывающего участка ферментов и облегчение фермент-субстратного взаимодействия. Здесь имеется консервативный остаток тирозина, фосфорилирование которого активирует всю молекулу STAT и позволяет ей взаимодействовать с SH2-доменом другой молекулы STAT. Это фосфорилирование необходимо для связывания с рецептором и для димеризации. На С-конце молекулы STAT имеется TAD-домен (transcriptional activation domain), который моделирует транскрипционную активность. TAD регулирует также взаимодействие STAT с рядом ядерных коактиваторов, облегчая модификацию хроматина и активацию транскрипции. Кроме того, в структуре STAT-белков выделяют также связующий (линкерный) домен (linker domain), отделяющий ДНК-связывающий домен от SH2-домена [50].

Различными литературными источниками описано участие белков STAT в самых разнообразных процессах, таких как пролиферация, рост, дифференцировка клеток, апоптоз. При этом различные STAT могут выступать как агонисты одного и того же процесса, так и выполнять противоположные функции. Так, говоря о туберкулезной инфекции, важно отметить, что для эффективного иммунного ответа против *M. tuberculosis* необходимы полноценность и своевременность процессов пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 из наивных Т-клеток. Дифференцировка CD4<sup>+</sup> Т-клеток может происходить двумя основными путями: Th1 и Th2. Тип дифференцировки в данном случае зависит в первую очередь от преобладания определенного цитокинового влияния: IL-27 и IL-12 в случае направления Th0-клеток по Th1-пути и IL-4 в случае дифференцировки по пути Th2. В данном случае IL-27 и IFN- $\gamma$  являются основными активаторами для транскрипционного фактора STAT1, IL-12 – для транскрипционного фактора STAT4, IL-4 – для STAT6, IL-2 – для факторов STAT3 и STAT5. На моделях дефицитных мышей также показано, что STAT4- и STAT6-нокаутные животные имеют нарушение Th1- и Th2-иммунного ответа соответственно. Продукты Th1- и Th2-лимфоцитов – IFN- $\gamma$  и IL-4 активируют соответствующие линии



клеток и угнетают альтернативные [22, 40, 49, 130, 166, 177, 217, 228].

В настоящее время установлены связи определенных JAK-киназ с факторами STAT при цитокин-опосредованной активации Т-лимфоцитов и их роль в формировании иммунного ответа. Так, в запуске клеточно-опосредованного иммунного ответа Т-лимфоцитов одну из ключевых ролей играют транскрипционные факторы STAT1, STAT4, а на более поздних его этапах – STAT3 и близкородственные STAT5A и STAT5B [120, 139].

STAT1-белок активируется фосфорилированными тирозинкиназными JAK1/JAK1-димерами (при IFN- $\gamma$ -индукции) или JAK1/ТYK2-димерами (при IL-27-индукции) и принимает роль посредника в активации Th0-лимфоцитов и их дифференцировке по Th1-пути. Он не активирует напрямую транскрипцию генов *IL2* или *IFNG*, являющихся основными маркерными цитокинами Т-хелперов типа 1, но влияет на активацию другого транскрипционного фактора – T-bet, который является специфическим фактором дифференцировки Th1-клеток, регулирующего экспрессию рецепторной  $\beta 2$ -субъединицы к IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ) и продукцию Т-лимфоцитарного, а также В-лимфоцитарного IFN- $\gamma$  [37, 38, 59, 101, 102, 104, 117, 170, 177]. Кроме того, показана роль STAT1 в реализации супрессивного действия IL-27 на транскрипционный фактор STAT6, являющийся основным транскрипционным фактором для Th2-лимфоцитов путем выраженной супрессии транскрипции фактора GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor 3) [38, 105, 130, 170].

Основная роль фактора транскрипции STAT4 связана с главным эффектом IL-12 – индукцией синтеза IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами. Активация данного транскрипционного фактора происходит при участии тирозиновых киназ JAK2 и TYK2. При этом включение STAT4 в иммунную реакцию происходит после того, как произойдет экспрессия рецептора IL-12R $\beta 2$ , индуцированная фактором T-bet. Таким образом, IL-12-активированный STAT4 играет главную роль в продукции лимфоцитарного IFN- $\gamma$  уже на этапе, когда клетки станут антигенспецифическими [101, 185, 217]. Кроме того, STAT4 ответственен за экспрессию на Т-клетках рецепторов к IL-18, который является синергистом IL-12, способствующим усилению IL-12-зависимой секреции IFN- $\gamma$  [38, 130].

STAT5-белок, представленный двумя изоформами (STAT5A и STAT5B), как правило, активируется тирозиновыми киназами JAK1 и JAK3, ассоциированными с

рецептором одного из ключевых Th1-направляющих цитокинов – IL-2. STAT5A и STAT5B кодируются тандемно сцепленными генами, имеют 95% гомологию и схожие функции, что позволяет их объединить под общим названием STAT5 [118]. Двойной нокаут по этим белкам полностью подавляет пролиферативный ответ и препятствует запуску в клеточный цикл периферических Т-клеток мышей, как в отсутствие, так и в присутствии IL-2 за счет тотальной супрессии продукции циклинов D2 и D3, а также циклин-зависимой киназы Cdk6 [2].

В процессе IL-2-индуцированной пролиферации Th1-клеток активируется транскрипционный фактор STAT3 при участии тирозиновых киназ JAK2 и TYK2. У мышей с недостаточностью по STAT3 наблюдается дефект IL-2-зависимой пролиферации Т-клеток, в основе которого лежит нарушение экспрессии IL-2R $\beta$  (CD122) и, вероятно, IL-2R $\alpha$  (CD25). Однако в отличие от STAT5 высокая концентрация IL-2 восстанавливает нормальный пролиферативный ответ таких лимфоцитов [170, 185].

Th2-дифференцировка наивных Т-лимфоцитов находится под контролем транскрипционных факторов STAT6, GATA-3 и c-maf, которые направлены на активацию продукции IL-4. Несмотря на то, что IL-4 может продуцироваться базофилами и тучными клетками, дифференцировка Th2-лимфоцитов осуществляется IL-4, секретлируемым в ответ на STAT6-зависимую активацию его продукции. Экзогенный IL-4 в данном случае выполняет роль «пускового механизма», активирующего STAT6-белки. STAT6-зависимая продукция IL-4 присуща только Th2. Кроме того, STAT6-белок активирует транскрипционные факторы GATA-3 и c-maf, которые вызывают дифференцировку активированных наивных Т-клеток по Th2-пути [22, 130, 148].

К настоящему времени в литературе нет полных сведений о динамике активации белков семейства STAT на всем протяжении пролиферативного ответа Т-лимфоцитов как в норме, так и при патологии. Если картина участия того или иного компонента системы JAK-STAT в формировании специфического иммунного ответа более менее ясна, то знаний о нарушениях со стороны данного сигнального пути при патологических процессах, в том числе и при туберкулезной инфекции, явно недостаточно.

#### **1.3.4 Транскрипционный фактор T-bet и его роль в JAK-STAT-сигнальной системе**

Транскрипционный фактор T-bet (T-box expressed in T cells) – член семейства T-box, был открыт как фактор транскрипции, который активирует экспрессию IFN- $\gamma$  T-лимфоцитами. В отличие от STAT1 и STAT4, которые не являются специфичными только для Th1, T-bet является уникальным фактором для Th1-дифференцировки T-клеток. Перенос T-bet в Th2-клетки перенаправляет их дифференцировку в Th1, что подтверждается продукцией IFN- $\gamma$  и отсутствием синтеза IL-4. Показано, что активация T-bet направляет дифференцировку T-лимфоцитов по Th1-пути ранее, чем это делает IL-12, за счет начальной, но недостаточной для длительного поддержания продукции IFN- $\gamma$ . Цитокин-зависимая активация T-bet возможна только с участием транскрипционного фактора STAT1. При этом наличие активного STAT1-димера в клетке – обязательное условие для индукции активности T-bet, что достигается влиянием IL-27 (на начальном этапе активации T-клеток) или IFN- $\gamma$  (на более поздних стадиях Th1-дифференцировки) [18, 115, 154, 190]. Показана способность T-bet активироваться не только под действием цитокиновых стимулов, но и через T-клеточный рецептор при взаимодействии APC с Th0-лимфоцитами. Активируясь через T-клеточный рецептор, T-bet способен самостоятельно стимулировать продукцию IFN- $\gamma$ . Однако и при этом пути индукции экспрессии T-bet важным условием остается наличие активных факторов STAT1, механизм активации которых через T-клеточный рецептор в условиях отсутствия цитокиновых сигналов в настоящий момент не установлен [17, 38, 63, 217, 230].

Одним из ключевых свойств T-bet является индукция экспрессии IL-12R $\beta$ 2 на наивных CD4<sup>+</sup> T-клетках [127, 172, 222]. Данный эффект устанавливается в IL-27-зависимой сигнализации, реализующей свое действие преимущественно по STAT1-зависимому и в меньшей степени по STAT1-независимому механизмам. Кроме того, показано, что активация экспрессии T-bet и продукции IFN- $\gamma$  при действии IL-27 усиливает воспаление, вызванное *M. tuberculosis* или их продуктами [38, 103, 104, 112, 154, 222].

Нокаут гена *TBX21*, кодирующего T-bet, приводит к полному подавлению синтеза IFN- $\gamma$  и нарушению дифференцировки Th1-клеток при активации как *in vitro*, так и *in vivo*. Выработка Th2-цитокинов при этом усиливается. Таким образом, IFN- $\gamma$  стимулирует экспрессию T-bet, и в то же время синтез IFN- $\gamma$  зависит от T-bet. Формируется петля положительной обратной связи, чем и достигается стабилизация фенотипа Th1-клеток [217, 230].

Итак, T-bet является еще одним принципиально важным транскрипционным фактором, участвующим в процессах пролиферации и дифференцировки Т-клеток, абсолютно необходимых для реализации эффективного иммунного ответа макроорганизма на агрессивное действие микобактерий туберкулеза. Однако, анализируя имеющуюся литературу по этому вопросу, можно заключить, что в аспекте туберкулезной инфекции роль фактора T-bet изучена мало, а представленные данные нередко носят противоречивый характер. В связи с этим, представляется актуальным более подробное изучение значения транскрипционного фактора T-bet в контексте патогенеза нарушений Т-клеточного иммунитета при микобактериальной инвазии.

#### **1.4 Основные и альтернативные пути секреции IFN- $\gamma$ в иммунном ответе на *Mycobacterium tuberculosis***

##### **1.4.1 CD3/TCR-опосредованная и IL-12/IL-27-зависимая секреция IFN- $\gamma$ Th1-лимфоцитами**

Как было отмечено ранее, продукция IFN- $\gamma$  является важным фактором для контроля над развивающейся инфекцией. Секреция IFN- $\gamma$  во многом зависит от активации Т-лимфоцитов-хелперов типа 1, и, как указывалось выше, протекает по двум путям: через Т-клеточный рецептор и через систему цитокинов [24, 50, 119, 185, 223, 224].

Продукция IFN- $\gamma$ , связанная с активацией CD3/TCR, осуществляется с помощью индукции транскрипционного фактора T-bet, который способен самостоятельно стимулировать продукцию IFN- $\gamma$  при наличии активных факторов STAT1. Кроме того, активация Th1-клеток через CD3/TCR приводит к секреции IL-2, являющегося основным ауто- и паракринным ростовым фактором, ответственным за пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов. Взаимодействие IL-2 со своим рецептором приводит к активации ассоциированных с ним тирозиновых киназ JAK2 и TYK2, активный гетеродимер которых участвует в фосфорилировании и последующей димеризации транскрипционного фактора STAT3. Транслоцированный в ядро клетки активный STAT3-димер вызывает экспрессию гена T-bet, который, в свою очередь, индуцирует экспрессию гена IFN- $\gamma$  [14, 24, 82, 229]. Таким образом, в результате стимуляции лимфоцитов через CD3/TCR возможна активация синтеза IFN- $\gamma$ . Однако считается, что

наработанная таким образом доля цитокина является незначительной и недостаточной для эффективной защиты против *M. tuberculosis*, а путь секреции IFN- $\gamma$  через активацию CD3/TCR – не основным.

Наряду с процессами передачи активационного сигнала лимфоцитам через T-клеточный рецептор происходит индукция Th1-дифференцировки посредством продуцируемых APC цитокинов семейства IL-12. Многочисленными исследованиями показано, что для «необходимой» ориентации дифференцировки наивных T-клеток в направлении T-хелперных клонов типа 1 необходимо участие как минимум двух цитокинов семейства IL-12: IL-12 и IL-27 [119, 127, 143, 152, 155, 172, 207, 236].

Являясь гетеродимерными цитокинами, состоящими из двух субъединиц, синтезируемых отдельно друг от друга, IL-12 и IL-27 проявляют свою активность при условии, что обе субъединицы (для IL-12 это p35 и p40, для IL-27 - EBI3 и p28) синтезированы в одной клетке [38, 140, 218]. Качество индуцирующего влияния IL-12 и IL-27 обеспечивается наличием на поверхности клетки-мишени рецепторов к одноименным цитокинам. Для каждой из субъединиц, составляющих биологически активную молекулу как IL-12, так и IL-27, характерно соединение с определенными субъединицами своих специфических рецепторов, имеющих по аналогии с интерлейкинами гетеродимерное строение: IL-12R $\beta$ 1/IL-12R $\beta$ 2 – рецептор для связывания IL-12; WSX-1/gp130 – рецептор для связывания IL-27. Одно из таких взаимодействий является решающим для проведения сигнала внутрь клетки, другое – обеспечивает прочное крепление рецептора с лигандом. Так, для IL-12 установлено, что субъединица p40 участвует в связывании с рецептором, а p35 необходима для трансдукции сигнала. При этом IL-12R $\beta$ 1 является связующей частью рецептора, а IL-12R $\beta$ 2 – активационной при передаче сигнала внутрь клетки. Мембрана покоящихся T-лимфоцитов содержит только конституциональную  $\beta$ 1-субъединицу рецептора к IL-12, что снижает его сродство к стимулирующим сигналам цитокина. Цитокином, способствующим экспрессии индуцибельной  $\beta$ 2-субъединицы рецептора к IL-12 на лимфоцитах, является IL-27, EBI3-субъединица которого является секреторным специфическим рецептором и имеет выраженную гомологию с p40 IL-12, отвечающую за связь лиганда с рецептором, а p28-субъединица гомологична субъединице p35 IL-12 [38, 127, 130, 190, 213, 236].

Известно, что IL-12/IL-27-зависимая активация T-лимфоцитов протекает с

позападным включением цитокинов в активационный процесс. В качестве первого индуктора выступает IL-27, который, взаимодействуя со специфическим рецептором, запускает каскад активации ключевых Янус-киназ (JAK1/ТYK2) и транскрипционного фактора STAT1. Результатом такой активации становится первичная индукция транскрипционного фактора T-bet, что является главным эффектом IL-27 на данном этапе. Активированный T-bet запускает наработку IFN- $\gamma$  и его рецептора CD119, а также  $\beta$ 2-субъединицы рецептора к IL-12 [112, 154, 172], экспрессия которой обеспечивает полноценный сигнал от одноименного цитокина (Рисунок 2).

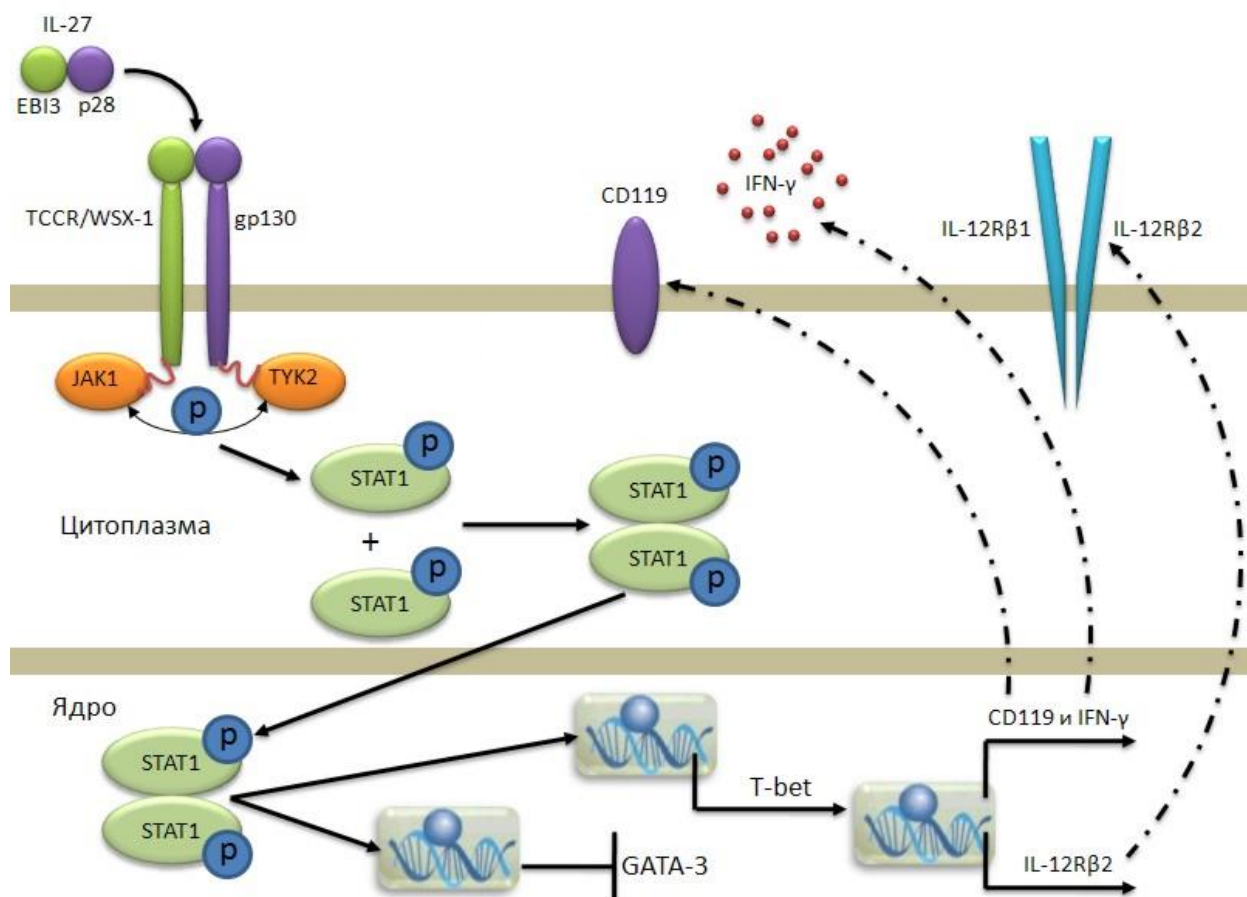


Рисунок 2 – IL-27-зависимая активация сигналинга JAK-STAT в лимфоцитах (оригинальная схема, составленная по данным литературы)

IFN- $\gamma$ , секретируемый на данном этапе цитокин-зависимой активации Т-лимфоцитов в незначительных объемах, в большей степени способствует усилению «поляризации» Т-хелперных клонов по Th1-пути, в меньшей – стимулирует макрофаги, DC и CTL. Усиление «поляризации» в данном случае подразумевает локальное влияние IFN- $\gamma$  на секретирующую его клетку через специфический рецептор с повторным запуском активационной цепи «STAT1 – T-bet – IFN- $\gamma$ » при участии JAK1-киназ [52,

107, 118, 170, 177, 185]. Действие первично наработанного IFN- $\gamma$  заканчивается, когда на наивных Т-клетках экспрессируется IL-12R $\beta$ 2 [121].

С экспрессией IL-12R $\beta$ 2-субъединицы начинает проявлять свою функциональную активность IL-12. Одновременное взаимодействие IL-12p40 с IL-12R $\beta$ 1 и IL-12p35 с IL-12R $\beta$ 2, экспрессированной под действием белка T-bet, является своего рода «пусковым рычагом» для запуска следующего этапа сигнальной JAK2/ТYK2-STAT4-трансдукции (Рисунок 3).

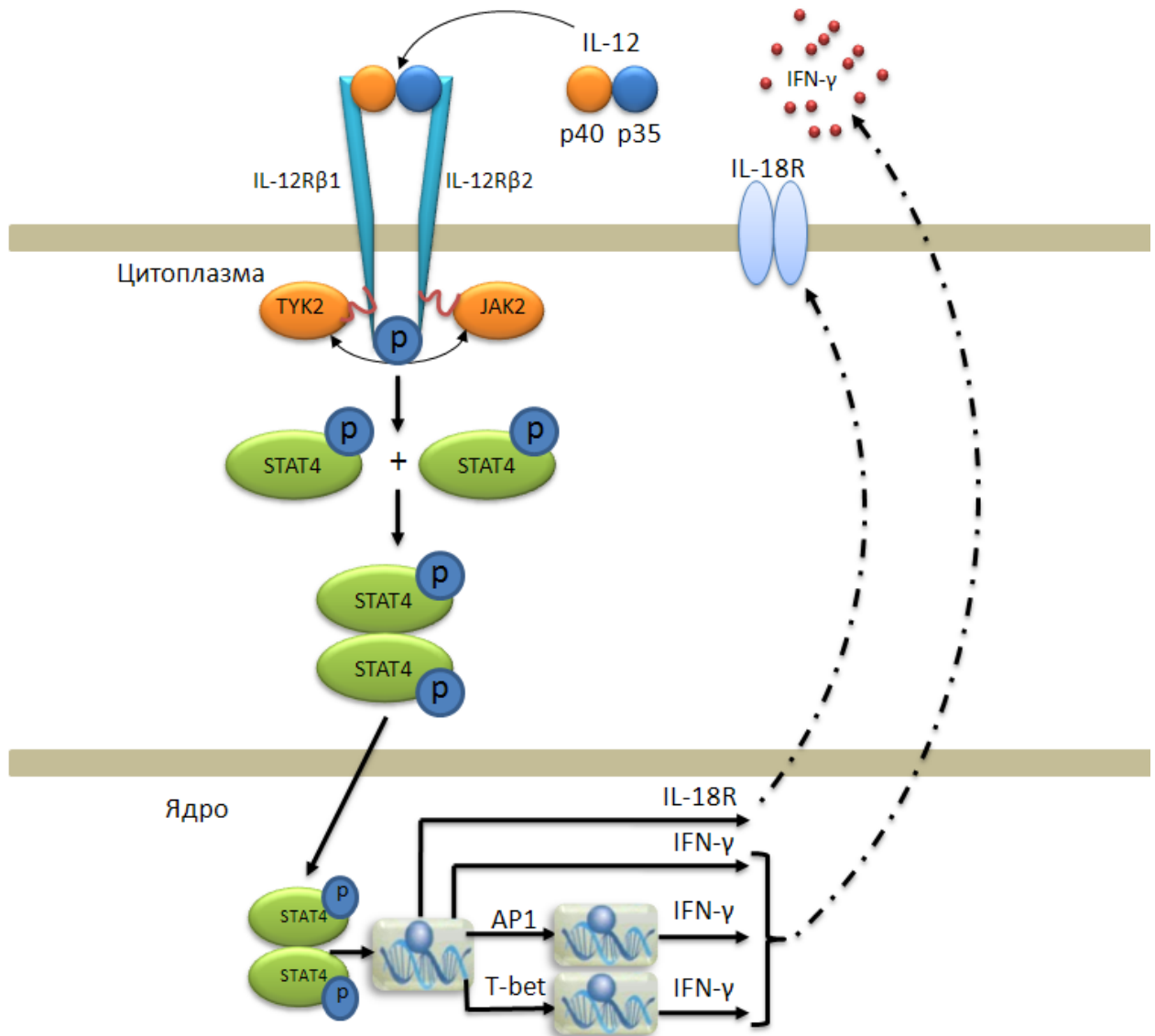


Рисунок 3 – IL-12-зависимая активация сигналинга JAK-STAT в лимфоцитах (оригинальная схема, составленная по данным литературы)

Так, связь IL-12R со своим лигандом сопровождается совместной активацией JAK2 и ТYK2. При этом IL-12 $\beta$ 1 ассоциирована с ТYK2-киназой, в то время как IL-12R $\beta$ 2 – с JAK2. Далее киназы подвергаются автофосфорилированию, которое параллельно сопровождается фосфорилированием определенных тирозиновых остатков

на соответствующих цепях IL-12R. В частности, JAK2 фосфорилирует тирозин, находящийся в 800-ом положении аминокислоты в IL-12R $\beta$ 2. Этот тирозин становится «посадочной площадкой» для STAT4. Связывание STAT4 с фосфорилированным тирозином IL-12R $\beta$ 2 в свою очередь становится сигналом для фосфорилирования самого STAT4 янус-киназой JAK2. Те же процессы протекают под влиянием TYK2-киназы, ассоциированной с IL-12R $\beta$ 1. Череда этих событий приводит к выходу активированного STAT4 из места связывания, его димеризации и транспорта в ядро клетки [107, 217]. В ядре STAT4 может как напрямую индуцировать экспрессию генов *IFNG* и рецептора к IL-18, так и опосредовано, через индукцию транскрипционных факторов AP-1 (c-Jun) и T-bet, приводящих к экспрессии гена *IFNG* (Рисунок 3). Включение IL-18, продуцируемого APC, в интерфероногенез в тандеме с IL-12 приводит к максимальной выработке IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами. Все это позволяет клетке поддерживать секрецию необходимых для эффекторных функций количеств IFN- $\gamma$  [38, 44, 135, 210, 217].

Таким образом, IFN- $\gamma$  – основной продукт Th1-клеток, и все факторы, направляющие дифференцировку T-хелперов по пути Th1, прямо или косвенно способствуют экспрессии гена *IFNG*. Основными индукторами секреции IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами в случае «нормального» срабатывания механизмов формирования иммунного ответа на внутриклеточный патоген являются IL-12 и IL-27, наиболее эффективно действующие в комбинации. К внутриклеточным факторам, определяющим включение гена *IFNG*, относят транскрипционные факторы STAT1, STAT4 и T-bet, через которые реализуется действие IL-27 и IL-12. При этом экспрессия транскрипционного фактора T-bet и секреция IFN- $\gamma$  формируют петлю положительной обратной связи, стабилизирующую выработку IFN- $\gamma$  Th1-клетками. Секретируемый при этом эффекторный IFN- $\gamma$  стимулирует секрецию макрофагами и дендритными клетками IL-12. Таким образом, происходит формирование функционального тандема IL-12 – IFN- $\gamma$ . Поскольку в основе защиты от многих патогенов, включая *M. tuberculosis*, лежит активная воспалительная реакция, нарушение этого тандема приводит к отсутствию или несостоятельности участвующих в противотуберкулезном ответе компонентов, что может негативно влиять на течение туберкулезной инфекции, способствовать ее прогрессированию [17, 25, 38, 69, 158, 170, 171, 185].

#### **1.4.2 Альтернативные пути секреции IFN- $\gamma$ при микобактериальной инвазии**



Показано, что бактериальные инфекции, не исключая туберкулезную, сопровождаются глубокой иммуносупрессией. *M. tuberculosis* оказывает многообразное повреждающее действие на иммунную систему, включая иммунодепрессию, инактивацию переваривающей функции макрофагов, запуск аллергической реакции по типу гиперчувствительности замедленного типа. Кроме того, возбудитель туберкулеза способен выделять вещества, обладающие прямым токсическим действием на клетки, ткани и иммунную систему организма [77, 78, 94, 150, 175].

Многочисленными исследованиями последнего десятилетия показано, что иммуносупрессия при туберкулезной инфекции проявляется, главным образом, выраженной Т-лимфоцитопенией [26, 45, 60, 61, 78, 125]. Подобный иммунодефицит связан со специфическим влиянием *M. tuberculosis* на лимфоциты ввиду их тропности к лимфоидной ткани, опосредованного токсического действия на Т-клетки, индукции программированной гибели лимфоцитов [78]. Рядом исследователей было продемонстрировано выраженное снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких независимо от лекарственной чувствительности возбудителя. Учитывая, что CD4<sup>+</sup>-лимфоциты играют ключевую роль в формировании Th1-иммунного ответа, дефицит данной субпопуляции клеток имеет негативные последствия в борьбе с патогеном, связанные, в частности, со снижением их цитокин-секреторной активности [45, 61, 78, 125, 162].

Анализируя неоспоримую важность выполняемых IFN- $\gamma$  функций при туберкулезной инфекции, можно предположить, что с дефицитом именно данного цитокина может быть связана дисрегуляция иммунной системы при инфекции, индуцированной *M. tuberculosis*. Данное предположение вполне оправдано, однако анализ данных литературы по этому вопросу показывает, что у больных туберкулезом легких, напротив, часто регистрируется гиперпродукция IFN- $\gamma$  в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* [25, 27, 225]. Этот факт связывают с увеличением числа Т-регуляторных (Treg) лимфоцитов, а также НК-клеток и усилением их IFN- $\gamma$ -продуцирующей активности на фоне иммунопатологического процесса, вызванного *M. tuberculosis* [8, 27, 47, 60, 61, 77, 78, 88, 189, 197, 210].

Так, большой интерес в вопросе иммунопатогенеза туберкулезной инфекции представляют натуральные киллеры, функции которых в настоящее время

рассматриваются двояко: как компонента неспецифической защиты организма и как участников клеточно-опосредованного иммунного ответа. Наиболее важным в данном аспекте свойством является способность НК напрямую уничтожать клетки, инфицированные внутриклеточными возбудителями, и ингибировать размножение микроорганизмов в этих клетках посредством синтеза ряда цитокинов, важнейшими из которых являются TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . НК, в отличие от макрофагов, Т- и В-лимфоцитов преимущественно лишены определенных клеточных маркеров, а их цитотоксичность не ограничивается главным комплексом гистосовместимости. Спонтанная, связанная с клетками цитотоксичность, считается автономной клеточной системой и опосредована, главным образом, содержащимися в них азурофильными гранулами. Естественные киллеры способны распознавать «незамеченные» обычными CD8<sup>+</sup> цитотоксическими лимфоцитами антигены МНС-независимым путем [74, 78, 124, 189, 197]. При этом НК-клетки секретируют IFN- $\gamma$ , повышенную секрецию которого на первый взгляд можно рассматривать как одну из компенсаторных реакций на фоне дефицита Th1-клеток. Однако существует мнение, что IFN- $\gamma$ , продуцируемый НК-клетками даже в значительных количествах, не обладает выраженным эффектом своего Th1-гомолога и малоэффективен в процессах активации макрофагов и DC в Th1-иммунном ответе [238]. Вероятным объяснением этому могут стать различные механизмы активации натуральных киллеров.

Так, показано, что синергичное влияние IFN- $\gamma$  и IL-2, продуцируемых Th1-лимфоцитами при «адекватном» иммунном ответе на внутриклеточный патоген, способно в разы увеличивать как цитолитическую активность НК-клеток, так и собственную IFN- $\gamma$ -продукцию. Секретируемый таким способом IFN- $\gamma$ , вероятнее всего, будет гомологичен по своим эффектам с таковым от Th1-клеток. Однако дефицит IL-2, регистрируемый более чем в 90% случаев при туберкулезе легких, и предполагаемая недостаточность Th1-лимфоцитарного IFN- $\gamma$  позволяют исключить данный механизм как основной, приводящий к гиперпродукции IFN- $\gamma$  НК-клетками [45, 60, 74, 78, 125, 126, 169, 177].

При контакте с клеткой-мишенью НК-клетки также способны секретировать в высоких дозах IFN- $\gamma$ , который по ауто- и паракринному механизму активирует естественные киллеры без участия клеточных предшественников. Интерферон, вырабатываемый НК-клетками, в данном случае способствует пополнению

субпопуляции самих НК-клеток, усиливает их литические способности, стимулирует дифференцировку предшественников НК-клеток [60, 74, 78, 126, 177]. Секретируемый таким способом IFN- $\gamma$  обладает локальным действием, которое направлено, в большей степени, на поддержание НК-клеточной субпопуляции, и в меньшей – на активацию макрофагов/DC и CTL, являющихся основными клетками-эффекторами в Th1-иммунном ответе [134, 177, 189, 199, 220].

Активация НК-клеток посредством прямого влияния на них IL-12 и IL-27 также способно приводить к секреции IFN- $\gamma$ . Показано, что НК-клетки в ответ на IL-12/IL-27-стимуляцию способны отвечать высокой продукцией IFN- $\gamma$  в значительно короткий, в отличие от Th1-лимфоцитов, срок. Однако продуцируемый таким путем IFN- $\gamma$ , по всей видимости, является элементом компенсации, направленной на усиление активности макрофагов/DC, CTL и самих НК-клеток на начальных этапах формирования иммунного ответа, пока в «дело» не вступит его Th1-гомолог [134, 177, 199].

Известно, что Treg-клетки, или CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp<sup>+</sup>-лимфоциты, являются центральными регуляторами иммунного ответа, способными контролировать силу и продолжительность иммунного ответа Т-клеток посредством их супрессии, разобщения процессов активации и ограничения роста [20, 145, 146, 188, 199, 208]. Данные о значимости Т-регуляторных лимфоцитов в межклеточной кооперации при туберкулезной инфекции значительно расширились в течение прошедшего десятилетия. Многочисленными исследованиями установлено, что при инфицировании *M. tuberculosis* в крови происходит увеличение числа Treg-лимфоцитов на фоне снижения содержания Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 и гиперпродукции IFN- $\gamma$  [9, 28, 31, 33, 77, 78, 88, 91, 225]. При этом показано, что Treg способны секретировать IFN- $\gamma$ , который, однако, обладает негативным влиянием на течение Th1-иммунного ответа [1, 38, 156, 238].

Так, К. Wood и В. Sawitzki [238] была продемонстрирована способность IFN- $\gamma$ , секретированного Treg, ингибировать пролиферацию наивных Т-клеток и индуцировать их преждевременную гибель путем запуска программы апоптоза. Авторы полагают, что непосредственное взаимодействие APC с Treg-лимфоцитами приводит к быстрой секреции последними значительных количеств IFN- $\gamma$ . Синтезированный подобным образом интерферон обладает колоссальным по силе «сродством» к клеткам, несущим на своей поверхности обе цепи рецептора к его молекулам (IFN- $\gamma$ R1 и IFN- $\gamma$ R2), среди

которых находятся и Th0-лимфоциты. Получившие подобный сигнал наивные T-лимфоциты очень быстро подвергаются апоптозу. В отличие от незрелых клеток, Th1-лимфоциты, несущие только IFN- $\gamma$ R1, получают частичный апоптогенный сигнал. Их пролиферация продолжается, однако процесс протекает значительно медленнее и эффекторные функции клеток выражены слабее.

Продемонстрировано, что продуцируемый Treg-клетками IFN- $\gamma$  оказывает паракринное действие на APC, инициируя в них активацию специфического фермента – индуцибельной синтазы окиси азота (NO-синтазы, iNOS), что сопровождается синтезом из L-аргинина значительных количеств монооксида азота (NO). Обладая липофильными свойствами, NO легко диффундирует в расположенные рядом T-лимфоциты, химически модифицируя внутриклеточные протеины и связываясь с железом гемсодержащих транскрипционных факторов, ингибирует тем самым процессы пролиферации и запускает апоптоз T-клеток. Показана также способность NO снижать экспрессию антиапоптотического гена *bcl-xl* и увеличивать ее применительно к проапоптотическому гену *bax* [1, 151, 221, 238].

Паракринное действие IFN- $\gamma$ , секретированного Treg и другими клетками, помимо активации iNOS, запускает работу других ферментов, таких как индолеамин-2,3-диоксигеназа (IDO) и гемоксигеназа (HO-1). Активация IDO в макрофагах/DC сопровождается переходом триптофана в N-формилкинуренин, а далее в 3-гидроксиантраниловую кислоту. Индукция IDO за счет синтеза иммуносупрессивных метаболитов триптофана приводит к супрессии T-клеточных реакций, подавляя пролиферацию T-лимфоцитов или вызывая их апоптоз. Активность HO-1 при Th1-зависимом воспалении приводит к гибели Th1-лимфоцитов, обусловленной генерацией тех же токсических метаболитов триптофана [1, 73, 153, 204, 238].

Таким образом, помимо продукции IFN- $\gamma$  в процессе функционирования Th1-опосредованного иммунного ответа существуют альтернативные пути секреции интерферона T-регуляторными и естественными киллерными клетками. Однако секретированный альтернативным путем IFN- $\gamma$  не обладает стимулирующими эффектами, а, напротив, оказывает негативное влияние на процессы пролиферации и созревания T-клеток, необходимых для полноценного клеточно-опосредованного иммунного ответа против *M. tuberculosis*. В связи с этим становится очевидным, что для эффективного иммунного ответа на внутриклеточно паразитирующие микобактерии туберкулеза

необходим именно Th1-лимфоцитарный фактор, основным путем секреции которого считается IL-12/IL-27-опосредованный запуск JAK-STAT-системы в Т-клетках. Ввиду того, что сведений, касающихся функционирования ключевых звеньев JAK-STAT-сигнализации при туберкулезе недостаточно, а выпадение или неполноценность любого ее компонента может стать причиной дисрегуляции иммунного ответа на инфектоген, необходимо детальное исследование основных компонентов сигнального пути JAK-STAT при данной патологии.

## Заключение

Подводя итог представленным в разделе данным, можно заключить, что исход туберкулеза легких во многом зависит от функциональной активности и согласованной работы всех компонентов иммунной системы, участвующих в распознавании, уничтожении и элиминации патогена из организма. При этом особенно важной является корректная реализация основных молекулярных механизмов в каждом из звеньев Т-клеточного иммунитета, несостоятельность которых на уровне цитокинов, рецепторов или компонентов внутриклеточного сигналинга (киназ и транскрипционных факторов) может привести к нарушению иммунного ответа в целом. В аспекте туберкулезной инфекции особый научный интерес представляет сигнальная система JAK-STAT, итогом функционирования которой является наработка необходимых количеств IFN- $\gamma$  – ключевого цитокина для борьбы с *M. tuberculosis*. Выяснение функциональной активности янус-киназ и участия STAT-белков в регуляции транскрипции генов, кодирующих IFN- $\gamma$ , является необходимой базовой информацией для понимания значимости нарушений JAK-STAT-сигналинга при данной патологии. Более того, исследование данной сигнальной системы важно и из практических соображений. При наличии детальной информации о механизмах тонкой регуляции секреции IFN- $\gamma$ , об его участии в Th1-иммунном ответе, появляется возможность для развития мишень-ориентированной иммунотерапии больных туберкулезом легких, направленной на формирование адекватного режима функционирования генов, кодирующих факторы, необходимые для борьбы с инфекцией. Таким образом, комплексный анализ молекулярных механизмов нарушений иммунного ответа на уровне JAK-STAT-сигнальной системы Т-лимфоцитов при туберкулезе легких представляется актуальным и своевременным.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объект исследования

В ходе настоящего исследования было обследовано 97 пациентов (75 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 20 до 55 лет с распространенными деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза легких (ТЛ). Возрастно-половая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Возрастно-половая характеристика пациентов с туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	С учетом устойчивости <i>M. tuberculosis</i>	Пол пациента	Число обследованных лиц		Средний возраст, X±m
			Абс.	%	
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких	Лекарственно-чувствительный	Мужчины	17	17,53	38,86±2,18
		Женщины	9	9,28	
	Лекарственно-устойчивый	Мужчины	16	16,49	37,77±2,10
		Женщины	6	6,19	
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких	Лекарственно-чувствительный	Мужчины	21	21,65	42,58±2,39
		Женщины	4	4,12	
	Лекарственно-устойчивый	Мужчины	21	21,65	40,92±1,85
		Женщины	3	3,09	

На момент обследования все больные ТЛ поступили на стационарное лечение во фтизиатрическое отделение Томской областной клинической туберкулезной больницы из учреждений общей лечебной сети г. Томска и Томской области. При этом у 87,63% обследованных лиц (85 человек) ТЛ обнаруживался при непосредственном обращении в медицинское учреждение со специфическими жалобами, у остальных 12,37% пациентов (12 человек) инфекция обнаруживалась случайно при флюорографическом обследовании органов грудной клетки.

В зависимости от клинической формы ТЛ все пациенты были разделены на две группы: больные с инфильтративным и больные с диссеминированным ТЛ. Внутри каждой группы проводилось дополнительное разделение на подгруппы с учетом чувствительности *M. tuberculosis* к специфической противотуберкулезной химиотерапии: больные с лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ (Рисунок 4).

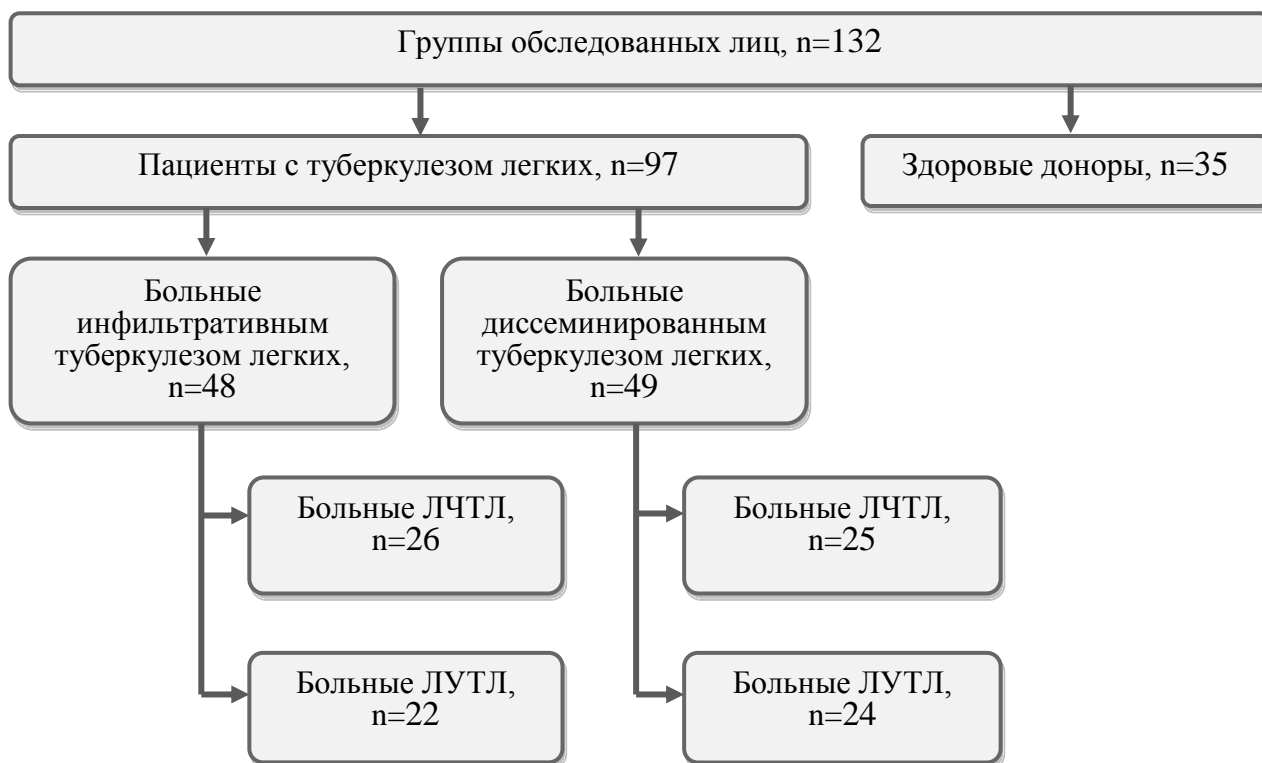


Рисунок 4 – Схема распределения обследуемых лиц по группам

*Примечание* – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких, ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких.

Диагноз ТЛ выставлялся врачами-фтизиатрами Томской областной клинической туберкулезной больницы (канд. мед. наук Л.Е. Петрова, канд. мед. наук О.В. Анастасов, А.А. Платоненкова, Е.П. Степанова, О.И. Новосельцева) на основании анамнеза больного, клинической картины заболевания (астеновегетативный синдром, характеризующийся слабостью, повышенной утомляемостью, субфебрильной температурой тела, снижением аппетита, резким похуданием, головными болями; бронхолегочные симптомы в виде кашля, одышки, выделения мокроты, кровохарканья, боли в грудной клетке, связанной с дыханием), рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты, которые были получены на базе лабораторий Томской областной туберкулезной больницы и Томского фтизиопульмонологического медицинского центра.

Диагноз инфильтративного ТЛ в фазе распада нескольких долей легкого был поставлен 48 (49,48%) обследованным больным, диссеминированная форма ТЛ диагностировалась у 49 (50,52%) пациентов. У 86 пациентов (88,66%) обнаруживался распространенный деструктивный характер поражения легочной ткани с вовлечением в



патологический процесс обоих легких.

Наличие *M. tuberculosis* в мокроте обследуемых лиц выявляли методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, и подтверждали методом люминесцентной микроскопии. Определение чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам проводили путем посева мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2 (метод абсолютных концентраций). Бактериовыделение регистрировалось в 100% случаев заболевания.

Осложнениями основного заболевания явились дыхательная недостаточность (54 человека, 55,67% случаев) и кахексия (38 человек, 39,18% случаев) различных степеней тяжести. Из сопутствующих заболеваний отмечались алкогольное поражение печени (20 человек, 20,61% случаев), синдром алкогольной зависимости (59 человек, 60,82% случаев), гастрит (19 человек, 19,59% случаев), язвенная болезнь желудка (18 человек, 18,56% случаев) в стадии ремиссии, хронический холецистит (5 человек, 5,15% случаев) в стадии ремиссии, описторхоз (5 человек, 5,15% случаев) в стадии ремиссии, ишемическая болезнь сердца (6 человек, 6,19% случаев), гипертоническая болезнь сердца (5 человек, 5,15% случаев).

Критериями исключения больных ТЛ из исследования считались: 1) возраст младше 20 и старше 55 лет; 2) наличие других клинических форм туберкулезной инфекции; 3) наличие аллергии и тяжелых сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза в стадии обострения; 4) терапия глюкокортикоидами и иммуномодулирующими препаратами.

В контрольную группу вошли 35 здоровых добровольцев (группа здоровья II) в возрасте от 20 до 55 лет. Все лица, входящие в группу контроля (26 мужчин и 9 женщин; средний возраст  $36,76 \pm 1,69$ ), прошли медицинский осмотр на базе ОГАУЗ «Поликлиника №3» г. Томска. Основными критериями включения в группу сравнения здоровых добровольцев являлись: 1) отсутствие патологических изменений в легких при флюорографическом исследовании; 2) отсутствие в анамнезе легочной патологии, тяжелых аллергических реакций и хронических инфекционных заболеваний; 3) частота заболеваемости острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями не более 3-х раз в год; 4) отсутствие в анамнезе инфекционных заболеваний в течение 3-х месяцев, предшествующих исследованию.

## **2.2 Материал исследования**

Материалом для исследования являлись лимфоциты венозной гепаринизированной (25 Ед/мл) крови, взятой утром натощак из локтевой вены в объеме 10 мл. Исследование проводилось однократно, до начала лечения. Все методы исследования выполнялись в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии при кафедре патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и лаборатории ЗАО «Томские клеточные технологии» (договор о совместной деятельности №28 от 5.06.2008).

## **2.3 Методы исследования**

### **2.3.1 Определение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови**

Определение общего количества лейкоцитов (ОКЛ) и их отдельных морфологических форм (лимфоциты) проводили на гематологическом анализаторе МЕК-6400 («Nihon Kohden», Япония).

*Принцип* работы прибора основан на кондуктометрическом методе (принцип Культера), заключающемся в регистрации электрических импульсов, возникающих при прохождении суспендированных клеток в растворе слабого электролита через небольшое отверстие (апертура), по обе стороны от которого расположены два изолированных электрода, между которыми течет электрический ток. Прохождение отдельной клетки через апертуру сопровождается возникновением электрического импульса, что связано с вытеснением каждой клеткой определенного количества электролита и возникновением импульсного увеличения сопротивления электрическому току в канале. В усилителе происходит изменение величины электрического тока, преобразование колебания силы тока в импульсы напряжения, прямо пропорциональные размеру клетки, прошедшей через апертуру.

Непосредственно перед исследованием с помощью лизирующего раствора осуществляется лизис эритроцитов до очень мелких частиц, которые при подсчете лейкоцитов генерируют электрические импульсы очень низкой амплитуды, не влияющие на результат анализа. Именно измерение амплитуды электрического сигнала

является основой разделения лейкоцитов на фракции: маленькие клетки – лимфоциты при прохождении через измерительный канал формируют импульсы низкой амплитуды, большие клетки – нейтрофилы – импульсы высокой амплитуды, средние клетки – моноциты определяются в промежуточной области. Принятие данными клетками необходимого дифференциального объема достигается за счет использования определенных концентраций растворителя и лизирующего раствора. В результате различные формы лейкоцитов претерпевают изменения размеров в разной степени и поэтому могут быть дифференцированы между собой описанным методом.

Исследование проводили согласно инструкции по эксплуатации фирмы-производителя прибора, используя контрольные гематологические образцы («Human», Германия) для контроля качества полученных результатов.

Результаты выражали в % и абсолютных числах ( $\times 10^9/\text{л}$ ).

### **2.3.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови**

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли методом дифференциального градиентного центрифугирования.

*Принцип метода.* Осаждение мононуклеарных лейкоцитов крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина с последующим отмыванием в буферной среде.

*Ход работы.* Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) в течение 30 мин выдерживали в термостате при температуре 37°C для отделения плазмы и эритроцитов. В это время в центрифужные стеклянные пробирки наливали по 1,5 мл фиколл-урографина ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ) и на градиент медленно наслаивали полученную плазму крови в соотношении 1:2. Центрифугировали при комнатной температуре при 500 g в течение 20 мин. Полученное после центрифугирования интерфазное кольцо из смеси мононуклеаров собирали с раздела фаз через верхний слой плазмы пипеткой, переносили в другую пробирку. Смесь в новой пробирке дважды отмывали средой RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), доводя объем до 10 мл, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз при 500 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли. Выделенные клетки вновь ресуспендировали в 1 мл раствора полной питательной среды, в состав которой входили 90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Россия), 10%

инактивированная эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (ООО «Биолот», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «Биолот», Россия) и 0,3 мг/мл L-глутамин (ООО «Биолот», Россия).

### **2.3.3 Выделение лимфоцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов методом адгезии к пластику**

*Принцип метода.* Избирательная способность моноцитарных клеток крови к прочной адгезии на пластике, стекле.

*Ход работы.* Разделение смеси мононуклеарных лейкоцитов на лимфоциты и моноциты осуществляли путем инкубирования культуральной взвеси клеток в стерильных одноразовых вентилируемых пластиковых чашках с обработанной для оптимальной адгезии клеток поверхностью («Corning Costar», США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2 ч при температуре 37°C. Это приводило к прочной адгезии моноцитов на поверхности пластика. Идентификацию клеток осуществляли, используя витальную окраску азури II-эозином. Прилипающую к пластику фракцию клеток дифференцировали как моноциты, а не прилипающую – как лимфоциты. Жидкую часть, содержащую лимфоциты, переносили в пробирку, центрифугировали 10 мин при 500 g, супернатант удаляли, к осадку добавляли 1 мл полной питательной среды.

### **2.3.4 Подсчет количества и определение жизнеспособности лимфоцитов в суспензии**

Подсчет количества клеток в полученной суспензии осуществляли стандартным гематологическим методом.

*Принцип метода.* Подсчет числа лимфоцитов в определенном количестве квадратов счетной сетки камеры Горяева (0,9 мм<sup>3</sup>) с пересчетом на 1 мл, исходя из объема квадрата (1/250 мкл) и разведения крови (в 20 раз) с помощью световой микроскопии.

*Ход работы.* 0,02 мл клеточной суспензии заполняли камеру Горяева и оставляли ее в горизонтальном положении на 1 мин для оседания лимфоцитов, после чего помещали на столик микроскопа. Подсчет лимфоцитов производили в 100 больших

квадратах по всей площади сетки, начиная с ее верхнего левого угла. Расчет числа лимфоцитов осуществляли по формуле 1:

$$X = (a \times 20 \times 250) / 100 \times 10^3 / \text{л} = a / 20 \times 10^6 / \text{мл} \quad (1);$$

где X – количество лимфоцитов в 1 мл клеточной суспензии;

a – сумма лимфоцитов, подсчитанных в 100 больших квадратах.

Результаты выражали в абсолютных числах ( $\times 10^6/\text{мл}$ ).

Жизнеспособность выделенных лимфоцитов оценивали по данным трипанового теста. Смешивали 0,1 мл суспензии клеток с 0,1 мл 0,5% трипанового синего («Serva», США). Полученной смесью заполняли счетную камеру Горяева. Подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и мертвых (окрашенных в синий цвет) лимфоцитов, выражая результаты в процентах. Для дальнейших исследований использовали клеточные суспензии, жизнеспособность клеток в которых была не менее 95%. Учет жизнеспособности клеток осуществлялся дважды, до и после процедуры культивирования с индукторами. Количество лимфоцитов в суспензии стандартизировали до  $2,5 \times 10^6/\text{мл}$ .

### 2.3.5 Специфическая индукция Т-лимфоцитов

*Принцип метода* основан на *in vitro* активации лимфоцитов крови посредством моделирования специфических Th1-направляющих сигналов с использованием индукторов Th1-пролиферативного ответа (IL-12 и IL-27).

*Ход работы.* Исследование наличия и качества индуцирующего влияния рекомбинантных цитокинов IL-12 и IL-27 («eBioscience Company», США) осуществляли в пробных сериях образцов, полученных от 5 здоровых добровольцев. Индукцию лимфоцитов проводили без и в присутствии блокатора внутриклеточного транспорта моненсина («Sigma», США), ингибирующего секрецию цитокинов, синтезированных во время активации. Подбор дозы индукторов, блокатора внутриклеточного транспорта и времени инкубации проводили в культуре лимфоцитов с фиксированной клеточностью ( $2,5 \times 10^6/\text{мл}$ ) и жизнеспособностью не менее 95%. Процент клеток, содержащих внутриклеточный IFN- $\gamma$  или фактор транскрипции T-bet, исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Оценка наличия и качества индукции осуществлялась

путем сравнения количества лимфоцитов, содержащих внутриклеточный IFN- $\gamma$  или фактор транскрипции T-bet, до и после добавления индукторов. На основании проведенных исследований было выбрано оптимальное соотношение доз и времени инкубации: концентрация IL-12 – 20 нг/мл, IL-27 – 10 нг/мл, моненсина – 5 мкг/мл; время инкубации с индукторами – 10 ч (IFN- $\gamma$ ), 1 ч (T-bet); время инкубации с моненсином – 8 ч (IFN- $\gamma$ ), 5 мин (T-bet); время добавления блокатора внутриклеточного транспорта – через 2 ч от начала индукции (IFN- $\gamma$ ), через 55 мин от начала индукции (T-bet). Установленные дозы использовались в дальнейшем для всех вариантов индукции:

- Для измерения содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1, STAT4 и тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в клеточных лизатах культивирование лимфоцитов осуществляли в полной питательной среде в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C без индукторов, далее в течение 1 ч в присутствии рекомбинантных цитокинов IL-12 (20 нг/мл) и IL-27 (10 нг/мл), после чего стимулированные клетки подвергали процессу поэтапной заморозки. Общее время инкубации составило 3 ч.

- Индукция транскрипционного фактора T-bet осуществлялась поэтапно: 1) выделенные лимфоциты инкубировали в полной питательной среде в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C; 2) далее к 1 мл лимфоцитарной взвеси добавляли рекомбинантные IL-12 (20 нг/мл) и IL-27 (10 нг/мл), содержимое перемешивали и продолжали инкубацию в течение 55 мин; 3) добавляли блокатор внутриклеточного транспорта моненсин (5 мкг/мл), продолжали инкубацию в течение 5 мин, после чего стимулированные клетки подвергали процессу поэтапной заморозки. Общее время инкубации составило 3 ч.

- Для стимуляции продукции IFN- $\gamma$  выделенные лимфоциты инкубировали в полной питательной среде в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C. Затем к 1 мл клеточной суспензии добавляли рекомбинантные IL-12 и IL-27 («Bioscience Company», США) в дозе 20 и 10 нг/мл соответственно и инкубировали пробы в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C в течение 2 ч, после чего добавляли блокатор внутриклеточного транспорта моненсин («Sigma», США) в концентрации 5 мкг/мл, перемешивали содержимое пипетированием и продолжали инкубацию в течение 8 ч,

после чего стимулированные клетки подвергали процессу поэтапной заморозки. Общее время инкубации составило 12 ч.

- Для оценки IFN- $\gamma$ -секретирующей способности лимфоцитов *in vitro*, лимфоциты инкубировали в полной питательной среде в течение 2 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C без добавления индукторов. Далее – в течение 48 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C в присутствии рекомбинантных цитокинов IL-12, IL-27 («eBioscience Company», США) в установленных концентрациях (20 нг/мл и 10 нг/мл соответственно), после чего стимулированные клетки подвергали процессу поэтапной заморозки. Общее время инкубации составило 50 ч.

Поэтапная заморозка осуществлялась путем добавления к клеточной суспензии 1 мл неинaktivированной ЭТС и 100 мкл 10% диметилсульфоксида (ДМСО) с последующей инкубацией криопробирок, содержащих исследуемые клетки, в контейнере с 96% этиловым спиртом при температуре –20°C в течение 24 ч, после чего спирт сливали и криопробирки переносили в морозильную камеру, обеспечивающую постоянное поддержание температуры на уровне –70°C. Длительность хранения образцов биологического материала не превышала 3 мес.

### **2.3.6 Приготовление лизатов лимфоцитов периферической крови**

Приготовление клеточных лизатов для определения содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1, STAT4 и тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 проводили с использованием лизирующего буфера (Cell Lysis Buffer) в соответствии с протоколом фирмы-производителя («Cell Signaling Technology», США). Согласно протоколу, клетки, прошедшие соответствующую индукцию (см. п. 2.3.5, стр. 45) отмывали 2 мл холодного фосфатно-солевого буфера (1X PBS) с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 500 g. Далее добавляли 400 мкл холодного лизирующего буфера (1X lysis buffer) и инкубировали в течение 5 мин при температуре 0-2°C, после чего перемешивали на жестком вортексе в течение 5 мин, центрифугировали при 14000 g, надосадок отбирали для исследования. Все процедуры осуществляли на холоде.

### 2.3.7 Определение содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 в лизатах лимфоцитов

Определение содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 в лизатах культуральных суспензий лимфоцитов проводили методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа.

Для определения содержания активных форм транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 в лизатах лимфоцитов проводили специфическую IL-12/IL-27-индукцию клеток в суспензии (см. п. 2.3.5, стр. 45).

Приготовление клеточных лизатов проводили на холоде с использованием лизирующего буфера (Cell Lysis Buffer) согласно прилагаемому протоколу производителя «Cell Signaling technology», США (см. п. 2.3.6, стр. 47).

*Принцип метода.* В основе метода лежит конъюгация одного эпитопа молекулы цитокина с мышиными МКАТ, сорбированными на твердой фазе микропланшета, и независимого эпитопа цитокина с другим типом антител – кроличьих поликлональных, специфичных против человеческих цитокинов. Избыток кроличьих антител удаляется. К сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» добавляется окрашивающий раствор, оптическая плотность которого прямо пропорциональна концентрации исследуемого цитокина и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей продуктов жизнедеятельности клеток, так называемая «0 доза», и стандартных растворов IFN- $\gamma$  с известной концентрацией.

*Ход анализа.* Процедуру выполнения иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли согласно методическим рекомендациям фирмы-производителя коммерческих наборов («Cusabio Biotech», США).

Твердофазный ИФА проводили по стандартной схеме: раскапывали по 100 мкл «0 дозы» и стандарта для цитокина в соответствующие ячейки. В оставшиеся ячейки помещали по 100 мкл супернатанта и 25 мкл поликлональных антител. Инкубировали планшет в термостате-шейкере при 37°C в течение указанного в методике времени. Трехкратно промывали на автоматическом вошере. В каждую ячейку добавляли по 50 мкл авидин-пероксидазы и инкубировали в термостате-шейкере в течение указанного в методике времени. После очередного двойного цикла промывок в лунки вводили 200



мкл окрашивающего раствора (тетраметилбензидин, ТМБ). Последнюю фазу инкубации осуществляли путем добавления в ячейки стоп-реактанта (0,5 М серная кислота).

Оптическая плотность содержимого ячеек планшета регистрировалась на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществлялся при помощи программного пакета «Multiscan Magic». Концентрацию фосфорилированных форм транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 вычисляли по калибровочной кривой. Результаты выражали в пг/мл.

### **2.3.8 Определение содержания активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов**

Определение содержания активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах культуральных суспензий лимфоцитов проводили методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа.

Для определения содержания активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов проводили специфическую IL-12/IL-27-индукцию клеток в суспензии (см. п. 2.3.5, стр. 45).

Приготовление клеточных лизатов проводили на холоде с использованием лизирующего буфера (Cell Lysis Buffer) согласно прилагаемому протоколу производителя («Cell Signaling technology», США; см. п. 2.3.6, стр. 47).

*Принцип метода ИФА* описан подробно в п. 2.3.7., стр. 48.

*Ход анализа.* Процедура выполнения ИФА осуществлялась аналогично охарактеризованной ранее (п. 2.3.7, стр. 48) в соответствии с методической рекомендацией по проведению твердофазного иммуноферментного метода фирмы-производителя коммерческих наборов («Cusabio Biotech», США).

Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи пакета программ «Multiscan Magic». Концентрацию активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 вычисляли по калибровочной кривой. Результаты представляли в пг/мл. Концентрацию фосфорилированных форм тирозиновых киназ вычисляли по калибровочной кривой, выражая результаты в пг/мл.

### **2.3.9 Определение внутриклеточного IFN- $\gamma$ и активной формы транскрипционного фактора T-bet в лимфоцитах периферической крови методом двухцветной проточной цитофлуориметрии**

*Принцип метода.* Выявление рассеяния света лазерного луча во время прохождения через него клетки в струе жидкости. Анализируемая суспензия клеток предварительно метится моноклональными антителами (МКАТ), на которых сорбированы специфические флуорохромы, попадает в струю жидкости, проходящую через проточную ячейку. Во время прохождения каждой отдельной клеткой лазерного луча детекторы анализируют интенсивность флуоресценции по четырем каналам флуоресценции: параметры малого углового светорассеяния, характеризующего размер клетки; параметры бокового светорассеяния, характеризующего мембранные и цитоплазматические показатели клетки; три показателя флуоресценции – зеленой (FITC – 530 нм), оранжевой (PE – 585 нм) и малиновой (PerCP – 610 нм) в гейте лимфоцитарных клеток, выявляемых на FL1-, FL2-, FL3-каналах.

*Ход работы.* Простимулированные лимфоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером, стандартизировали количество клеток в суспензии до  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. Перед окраской осуществляли Fc-блокировку клеток посредством добавления 1 мг человеческого IgG1 к 1 мл культуральной взвеси лимфоцитов с последующим инкубированием при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем в пластиковые центрифужные пробирки на 10 мл переносили по 1 мл Fc-заблокированных клеток, добавляя в каждую пробу по 5 мл раствора Дюльбекко. Перемешивали на мягком вортексе в течение 5 мин.

Окрашивание поверхностного маркера (CD3) T-лимфоцитов осуществляли путем добавления к суспензии клеток 10 мкл специфических МКАТ к CD3-молекуле, меченных перидинин-хлорофилл протеином (PerCP) («R&D Systems», США). Содержимое пробирки перемешивали 5 мин на вортексе и инкубировали 45 мин при температуре 2-8<sup>0</sup>С в защищенном от света месте. После инкубации непрореагировавшие антиCD3 дважды отмывали, внося в пробирки по 4 мл отмывочного буфера (рН=7,4), содержащего 500 мл раствора Дюльбекко и 2,5 мл неактивированной ЭТС. Содержимое пробирки перемешивали на вортексе 5 мин, центрифугировали в течение 5 мин при 500 g, затем надосадов удаляли.

Для окрашивания внутриклеточного транскрипционного фактора T-bet или внутриклеточного IFN- $\gamma$  проводили процесс фиксации и пермеабилзации лимфоцитов. Для этого в каждую пробирку вносили рабочий раствор фиксирующего буфера Flow Cytometry Fixation Buffer («R&D Systems», США), инкубировали клетки при комнатной температуре в темном месте в течение 10 мин, перемешивая каждые 2-3 мин. Однократно отмывали, добавляя 2 мл отмывочного буфера (pH=7,4) и центрифугируя в течение 7 мин при 200 g. Супернатант удаляли. Затем в каждую пробирку вносили по 2 мл пермеабилзирующего буфера (Permeabilization Buffer) («R&D Systems», США), повторно инкубировали при комнатной температуре в темном месте 10 мин. Однократно отмывали, добавляя 2 мл отмывочного буфера (pH=7,4) и центрифугируя в течение 7 мин при 200 g. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали, вносили антитела к внутриклеточному транскрипционному фактору T-bet, меченные флуоресцеином изотиоцианатом (FITC) («R&D Systems», США) или внутриклеточному IFN- $\gamma$ , меченных фикоэритрином (PE) («R&D Systems», США) в количестве 10 мкл на пробу. Инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 45 мин, после чего дважды отмывали, добавляя по 2 мл отмывочного буфера (pH=7,4) и центрифугируя в течение 7 мин при 200 g. Далее к осадку добавляли 400 мкл фосфатно-солевого буфера.

Все измерения проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur Flow cytometr BD» («Becton Dickinson», США), снабженном аргоновым лазером ( $\lambda=488$  нм) и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли с использованием программного приложения «BD Cell Quest for Mac OS® X». Анализ образцов клеточных суспензий проводили по четырем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки; боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические и мембранные особенности клетки; двум показателям флуоресценции – зеленой (FITC – 530 нм) или оранжевой (PE – 585 нм), в зависимости от изучаемого анализата, выявляемых на FL1-, FL2-каналах, а также малиновой (PerCP – 610 нм), выявляемой на FL3-канале.

На графике FSC против SSC выделяли гейт 1 – общее содержание лимфоцитов (Рисунок 5, А). Затем гейт 1 прикладывали к событиям на графике флуоресценции по третьему каналу FL3 (CD3-PerCP) против флуоресценции по первому каналу FL1 (T-bet-FITC) (Рисунок 5, Б) или второму каналу FL2 (IFN- $\gamma$ -PE) (Рисунок 5, В). На этом

графике в верхнем правом квадранте находились клетки, содержащие одновременно CD3 и T-bet или CD3 и IFN- $\gamma$ . Результаты выражали в % и абсолютных числах ( $\times 10^9$ /л).

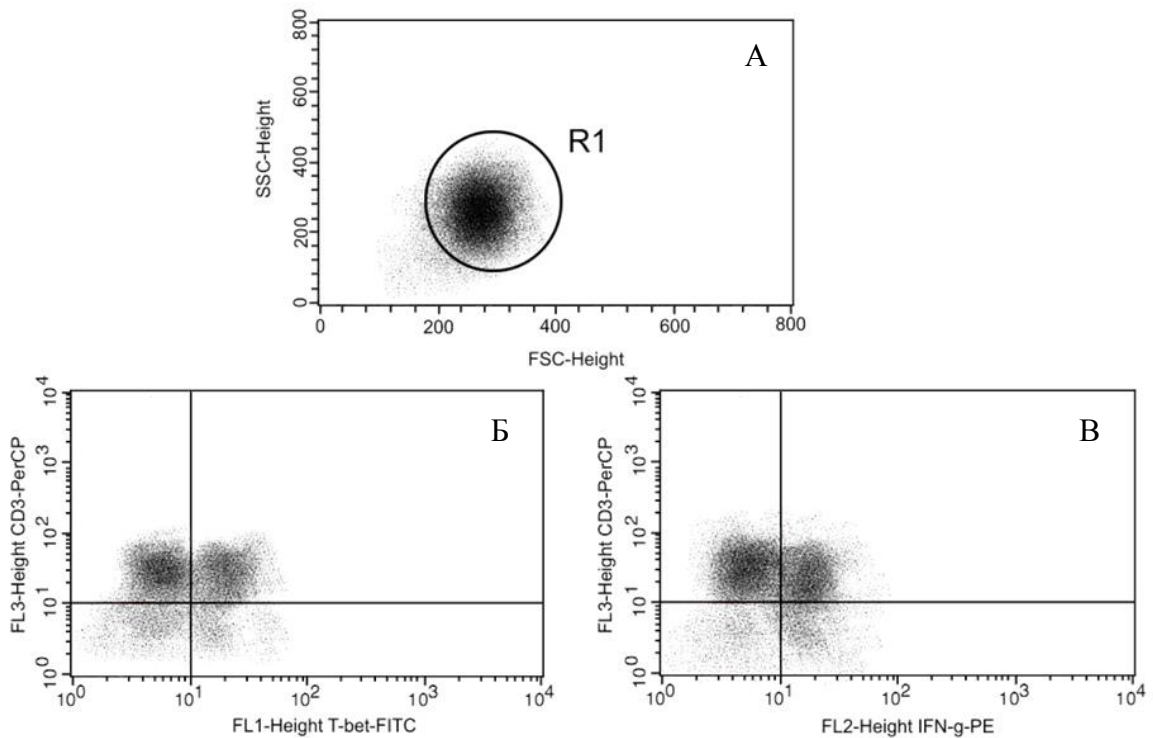


Рисунок 5 – Алгоритм двухцветного цитофлуориметрического исследования: А – выделение гейта R1 на графике FSC против SSC; Б – распределение флуоресценции гейта R1 по каналам FL1 (T-bet-FITC) и FL3 (CD3-PerCP); В – распределение флуоресценции гейта R1 по каналам FL2 (IFN- $\gamma$ -PE) и FL3 (CD3-PerCP)

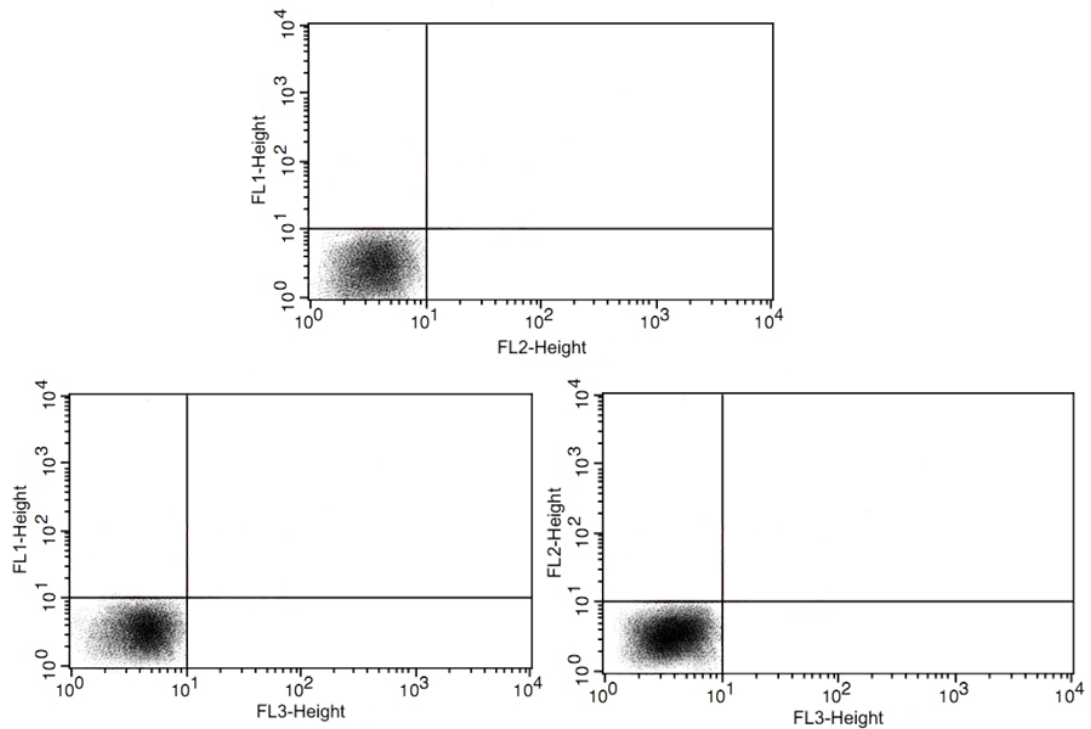


Рисунок 6 – Изотипический контроль флуоресценции на FL1-, FL2- и FL3-каналах

В исследовании применялся изотипический контроль МКАТ (мышинный IgG1), меченных PerCP, PE, FITC («R&D Systems», США), позволяющий идентифицировать и минимизировать границы неспецифического связывания рецепторов клеток образца со специфическими антителами. По данным исследования изотипического контроля устанавливались квадранты гейтирования (Рисунок 6).

### **2.3.10 Исследование базальной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$ лимфоцитами крови методом иммуноферментного анализа**

Определение секреции IFN- $\gamma$  в супернатантах культуральных суспензий лимфоцитов проводили методом твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа (ELISA).

Для определения IFN- $\gamma$ -секретирующей способности лимфоцитов проводили специфическую IL-12/IL-27-индукцию клеток в суспензии (см. п. 2.3.5, стр. 45).

*Принцип метода ИФА* описан подробно в п. 2.3.7, стр. 48.

*Ход работы.* Процедуру выполнения ИФА осуществляли аналогично охарактеризованной ранее (см. п. 2.3.7, стр. 48) согласно методическим рекомендациям фирмы-производителя коммерческих наборов («Cusabio Biotech», США).

Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи пакета программ «Multiskan Magic». Концентрацию IFN- $\gamma$  вычисляли по калибровочной кривой. Результаты представляли в пг/мл.

## **2.4 Статистический анализ результатов**

Анализ полученных 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 [6, 7, 96].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Общее количество лейкоцитов и содержание лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулёзом лёгких

При исследовании количественных показателей белой крови у больных туберкулёзом лёгких (ТЛ) независимо от клинической формы заболевания и варианта лекарственной чувствительности возбудителя к специфической химиотерапии было выявлено увеличение общего количества лейкоцитов (ОКЛ) относительно соответствующих параметров у здоровых доноров (Рисунок 7, А, Б).

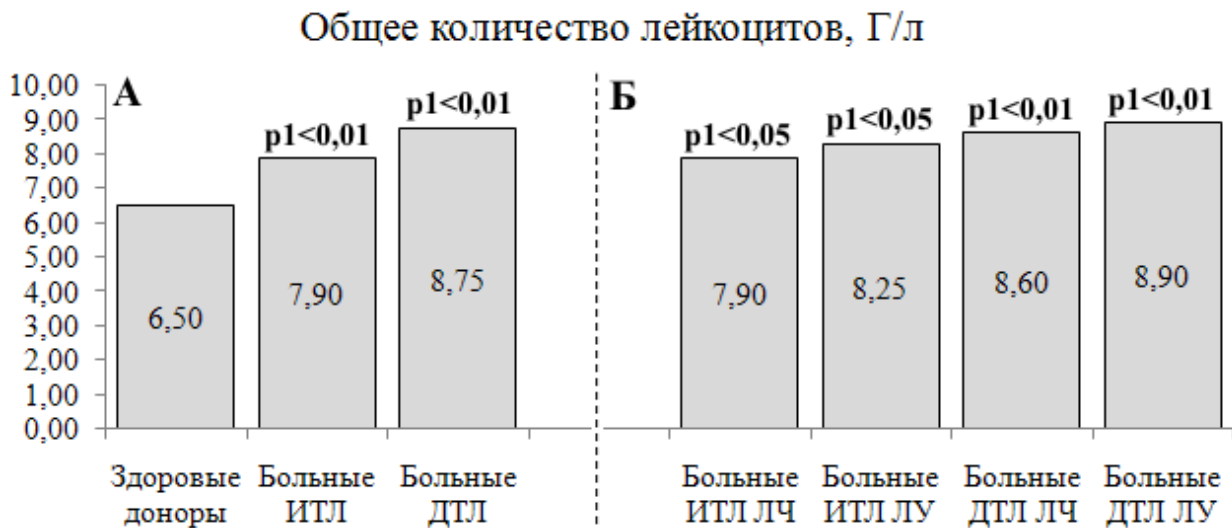


Рисунок 7 – Общее количество лейкоцитов крови у больных туберкулезом легких с учетом клинической формы заболевания (А) и лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (Б).

*Примечание* – Здесь и на рисунках 8-9: ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких; ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких; 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> – по сравнению с показателями у больных инфильтративным туберкулезом легких; p<sub>3</sub> – по сравнению с показателями у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри каждой клинической формы).

На фоне лейкоцитоза у пациентов с ТЛ, вне зависимости от клинической формы заболевания, регистрировалось снижение абсолютного и относительного числа лимфоцитов по сравнению с данным параметром в группе контроля, наиболее выраженное при инфильтративной форме ТЛ (Рисунок 8, А, В). Анализ численности

лимфоцитов крови с учетом лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* позволил также констатировать снижение данной популяции клеток относительно контрольных значений во всех группах обследуемых лиц (Рисунок 8, Б, Г). Исключение составили пациенты с диссеминированной формой лекарственно-устойчивого ТЛ, у которых абсолютное содержание лимфоцитов крови, несмотря на тенденцию к снижению, оставалось в пределах нормы (Рисунок 8, Б).

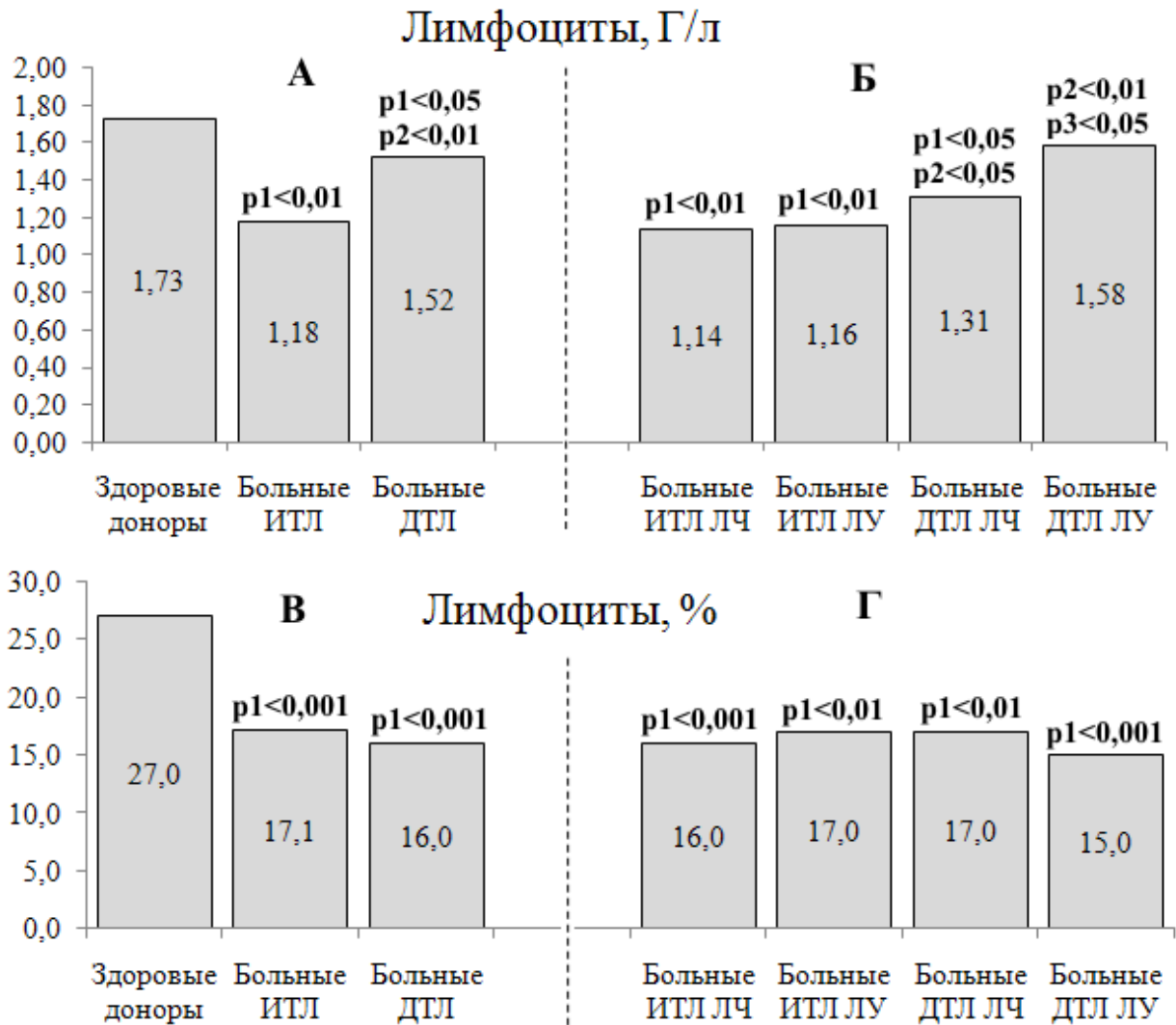


Рисунок 8 – Относительное и абсолютное содержание лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких с учетом клинической формы заболевания (А, В) и лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (Б, Г)

Таким образом, до начала специфической химиотерапии во всех группах обследуемых лиц, страдающих ТЛ, вне зависимости от клинической формы и варианта заболевания регистрировались однонаправленные изменения, проявляющиеся



относительной и абсолютной лимфопенией на фоне общего лейкоцитоза.

### 3.2 Содержание Т-лимфоцитов в крови у больных туберкулёзом лёгких

Исследование CD-популяционного состава лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких – инфильтративным (ИТЛ) и диссеминированным (ДТЛ) – позволило зарегистрировать снижение абсолютного и относительного числа всех CD3<sup>+</sup>-позитивных клеток по сравнению с аналогичным показателем у здоровых добровольцев, наиболее выраженное у пациентов в группе с ДТЛ (Рисунок 9, А, В).

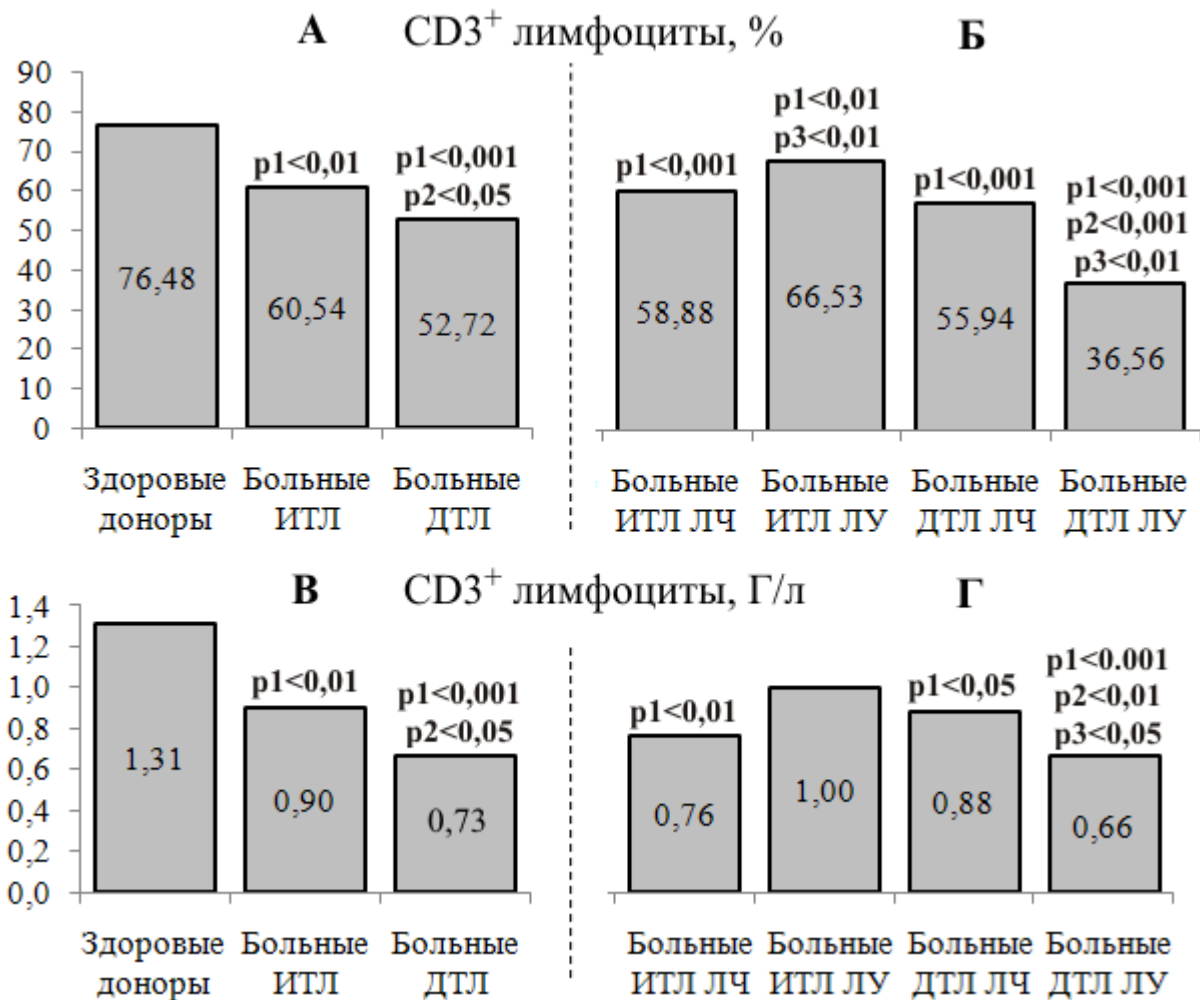


Рисунок 9 – Относительное и абсолютное содержание CD3<sup>+</sup> лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких с учетом клинической формы заболевания (А, В) и лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (Б, Г)

Анализ полученных данных в зависимости от варианта заболевания (лекарственно-чувствительный (ЛЧ) или лекарственно-устойчивый (ЛУ) ТЛ) позволил

выявить снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup> лимфоцитов во всех группах обследуемых лиц с ТЛ по сравнению с контрольным его уровнем. При этом наиболее выраженными данные изменения были у больных с диссеминированной формой ЛУТЛ, где численность CD3-позитивных клеток в 2,09 (для относительных значений) и в 1,98 раза (для абсолютных значений) была ниже нормы (Рисунок 9, Б, Г). Исключением явилась группа пациентов с инфильтративным ЛУТЛ, у которых, несмотря на тенденцию к снижению, численность CD3<sup>+</sup> клеток оставалось в пределах нормы (Рисунок 9, Б, Г).

### 3.3 Содержание активных форм факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких

В ходе исследования было установлено снижение концентрации активных форм (р-) транскрипционных факторов STAT1 и STAT4 в лизатах лимфоцитов после их направленной IL-12/IL-27-индукции у больных ТЛ независимо от клинической формы заболевания по сравнению с показателем в группе здоровых добровольцев (Таблица 2).

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

Группы обследованных лиц	p-STAT1, пг/мл	p-STAT4, пг/мл
Здоровые доноры	46,54 (31,80-55,53)	24,55 (17,92-30,00)
В зависимости от клинической формы туберкулеза легких		
Инфильтративный туберкулез легких	24,74 (19,80-29,43) p <sub>1</sub> <0,001	18,34 (13,36-20,56) p <sub>1</sub> <0,001
Диссеминированный туберкулез легких	21,97 (19,98-29,95) p <sub>1</sub> <0,001	19,72 (16,88-24,50) p <sub>1</sub> <0,001
В зависимости от лекарственной чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Инфильтративный ЛЧТЛ	29,43 (24,78-40,53) p <sub>1</sub> <0,01	19,65 (13,71-22,92) p <sub>1</sub> <0,05
Инфильтративный ЛУТЛ	20,02 (19,64-21,45) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>3</sub> <0,01	16,75 (12,74-18,55) p <sub>1</sub> <0,01
Диссеминированный ЛЧТЛ	22,20 (20,11-30,89) p <sub>1</sub> <0,001	19,70 (14,81-20,35) p <sub>1</sub> <0,05
Диссеминированный ЛУТЛ	20,26 (19,87-29,96) p <sub>1</sub> <0,001	11,07 (10,10-16,92) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,01

*Примечание* – p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – у больных инфильтративным туберкулезом легких; p<sub>3</sub> – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (каждая клиническая форма).

### 3.4 Содержание активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2 и TYK2 в лизатах IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких

Данные, полученные в ходе определения концентраций фосфорилированных форм (p-) тирозиновых янус-киназ JAK1, JAK2 и TYK2 в лизатах лимфоцитов у больных ТЛ представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Содержание активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2 и TYK2 в лизатах лимфоцитов крови после IL-12/IL-27-индукции *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц	p-JAK1, пг/мл	p-JAK2, пг/мл	p-TYK2, пг/мл
Здоровые доноры	20,89 (20,18-21,79)	18,62 (17,29-18,95)	20,91 (18,90-23,32)
В зависимости от клинической формы туберкулеза легких			
Инфильтративный туберкулез легких	17,24 (15,94-19,64) $p_1 < 0,05$	15,18 (14,89-16,41) $p_1 < 0,05$	12,82 (12,32-14,08) $p_1 < 0,001$
Диссеминированный туберкулез легких	17,07 (15,20-19,14) $p_1 < 0,05$	15,50 (13,78-17,32) $p_1 < 0,05$	13,93 (11,77-14,74) $p_1 < 0,001$
В зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя			
Инфильтративный ЛЧТЛ	17,75 (17,30-19,76) $p_1 < 0,05$	15,22 (15,03-16,40) $p_1 < 0,05$	13,26 (12,80-15,00) $p_1 < 0,01$
Инфильтративный ЛУТЛ	16,31 (15,70-16,86) $p_1 < 0,05$	14,95 (13,71-16,42) $p_1 < 0,05$	12,60 (12,10-12,83) $p_1 < 0,001$
Диссеминированный ЛЧТЛ	18,76 (17,10-19,48) $p_1 < 0,05$	16,62 (15,73-17,48) $p_1 < 0,05$	14,14 (13,80-14,75) $p_1 < 0,01$
Диссеминированный ЛУТЛ	15,44 (15,12-16,90) $p_1 < 0,05$	14,03 (13,20-14,51) $p_1 < 0,05$	12,04 (11,62-14,73) $p_1 < 0,001$

*Примечание* –  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров.

Как следует из представленных в таблице данных, во всех обследованных группах больных ТЛ, независимо от клинической формы и варианта заболевания, было зарегистрировано снижение концентраций активных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2 и TYK2 в лизатах лимфоцитов крови относительно тех же показателей в группе контроля.

Корреляционный анализ позволил установить наличие положительной взаимосвязи между концентрацией p-TYK2 и содержанием активной формы транскрипционного фактора STAT1 в лизатах лимфоцитов у больных инфильтративным ЛУТЛ ( $r=0,76$ ,  $p < 0,01$ ). Вместе с тем, была выявлена положительная корреляционная

взаимосвязь между концентрацией p-TYK2 и содержанием активной формы транскрипционного фактора STAT4 у больных инфильтративным ( $r=0,67$ ,  $p<0,05$ ) и диссеминированным ( $r=0,82$ ,  $p<0,01$ ) ЛУТЛ.

Таким образом, у больных ТЛ зарегистрирован дефект сигнального JAK-STAT-пути активации Т-лимфоцитов крови, проявляющийся снижением концентрации фосфорилированных форм внутриклеточных тирозиновых киназ JAK1, JAK2 и TYK2 и транскрипционных факторов STAT1, STAT4 в условиях направленной IL-12/IL-27-индукции клеток.

### **3.5 Количество IL-12/IL-27-индуцированных Т-лимфоцитов крови, содержащих транскрипционный фактор T-bet, у больных туберкулезом легких**

Данные, полученные в ходе определения количества Т-лимфоцитов, содержащих внутриклеточный транскрипционный фактор T-bet, после направленной IL-12/IL-27-индукции клеток *in vitro*, представлены в Таблице 4.

После IL-12/IL-27-индукции лимфоцитов *in vitro* у всех больных ТЛ, независимо от клинической формы заболевания, регистрировалось снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> клеток по сравнению с аналогичным показателем у здоровых добровольцев. При этом относительное и абсолютное содержание T-bet-негативной субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup>) при ДТЛ оставалось в пределах нормы. У пациентов с ИТЛ относительная численность CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup> клеток превышала значения данного показателя в группе контроля и у пациентов с ДТЛ в 1,17 и 1,20 раза соответственно. При этом их абсолютное содержание в 1,15 раза было выше контрольного уровня, но не отличалось от аналогичного показателя в группе с ДТЛ (Таблица 4, Рисунок 10).

Анализ полученных данных в зависимости от варианта ТЛ показал, что у больных как ЛЧТЛ, так и ЛУТЛ отмечается снижение процентного и абсолютного числа IL-12/IL-27-индуцированных CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями у здоровых добровольцев. При этом дефицит CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> клеток был более выраженным при лекарственно-устойчивом варианте диссеминированного ТЛ, где содержание T-bet-позитивных Т-лимфоцитов было в 3,45 (для относительного количества) и в 2,88 раза (для абсолютного количества) ниже значений аналогичных

показателей в группе контроля (Таблица 4).

Таблица 4 – Количество CD3<sup>+</sup> клеток, содержащих транскрипционный фактор T-bet, после IL-12/IL-27-индукции *in vitro* 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	$\frac{33,75 (30,44-38,31)}{0,501 (0,437-0,682)}$	$\frac{38,16 (34,12-41,89)}{0,574 (0,418-0,749)}$
В зависимости от клинической формы туберкулеза легких		
Инфильтративный ТЛ	$\frac{15,53 (12,69-19,62)}{0,219 (0,149-0,330)}$ p <sub>1</sub> <0,001	$\frac{44,78 (38,97-51,72)}{0,663 (0,460-1,005)}$ p <sub>1</sub> <0,05
Диссеминированный ТЛ	$\frac{14,73 (9,26-17,41)}{0,203 (0,138-0,294)}$ p <sub>1</sub> <0,001	$\frac{37,33 (34,82-40,08)}{0,575 (0,473-0,831)}$ p <sub>2</sub> <0,05
В зависимости от лекарственной чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Инфильтративный ЛЧТЛ	$\frac{16,53 (14,37-19,69)}{0,226 (0,155-0,302)}$ p <sub>1</sub> <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 <sub>1</sub> <0,001; p <sub>3</sub> <0,05	$\frac{51,72 (48,20-54,94)}{0,818 (0,520-1,005)}$ p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,001
Диссеминированный ЛЧТЛ	$\frac{17,65 (15,49-18,67)}{0,270 (0,160-0,420)}$ p <sub>1</sub> <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 <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,001	$\frac{36,23 (32,71-39,56)}{0,644 (0,478-0,691)}$ p <sub>2</sub> <0,001

Примечание – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких; 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>3</sub> – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри каждой клинической формы).

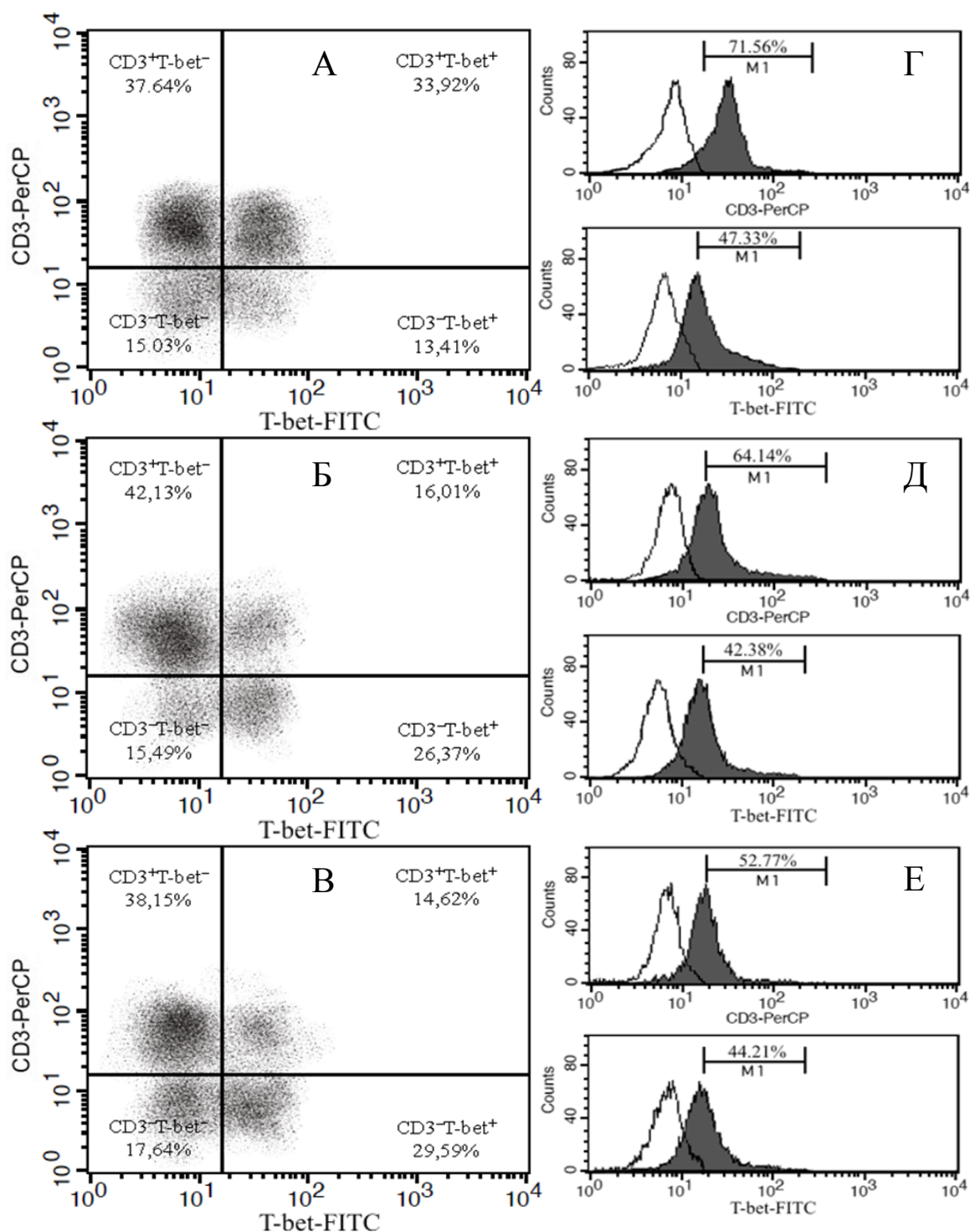


Рисунок 10 – Количество CD3-позитивных клеток, содержащих внутриклеточный транскрипционный фактор T-bet, после 1-часовой инкубации с индукторами (рекомбинантными IL-12, IL-27) *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких (по данным проточной цитофлуориметрии).

*Примечание* – Данные представлены на примере индивидуальных гистограмм распределения лимфоцитов крови по параметрам флуоресценции при окраске антителами к CD3 (PerCP) и T-bet (FITC) у здорового донора (А) и больных инфильтративным (Б) и диссеминированным (В) туберкулезом легких; Г, Д, Е – изотипический контроль флуоресценции.

Содержание  $CD3^+T-bet^-$  лимфоцитов оставалось в пределах контрольных значений у больных диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ, а также у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ (Таблица 4). У пациентов с инфильтративным ЛУТЛ было зафиксировано увеличение процентного и абсолютного числа  $CD3^+T-bet^-$  лимфоцитов, как относительно нормы (в 1,35 и 1,42 раза соответственно), так и относительно показателя в других группах пациентов с ТЛ (Таблица 4). Вместе с тем было установлено наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи между общим содержанием  $CD3^+T-bet^-$  лимфоцитов и концентрацией p-STAT4 в лизатах ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированных клеток при лекарственно-устойчивом варианте инфильтративного ТЛ ( $r=0,71$ ,  $p<0,01$ ).

Таким образом, у больных ТЛ в условиях ИЛ-12/ИЛ-27-индукции лимфоцитов отмечается дефицит клеток с фенотипом  $CD3^+T-bet^+$ . Наиболее значительные изменения выявляются при лекарственно-устойчивом варианте туберкулезной инфекции с большей степенью выраженности при диссеминированной его форме.

### **3.6 Количество ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированных лимфоцитов крови с внутриклеточным содержанием IFN- $\gamma$ у больных туберкулезом легких**

Результаты оценки внутриклеточного содержания IFN- $\gamma$  в ИЛ-12/ИЛ-27-индуцированных лимфоцитах крови у больных ИТЛ, ДТЛ и здоровых добровольцев представлены в Таблице 5.

Как следует из представленных в таблице 2 данных, установлено снижение относительного и абсолютного содержания  $CD3^+IFN-\gamma^+$  лимфоцитов как при ИТЛ (в 1,30 и 1,21 раза соответственно), так и при ДТЛ (в 1,37 и 1,48 раза соответственно) по сравнению с теми же показателями в контрольной группе (Таблица 5, Рисунок 11). Вместе с тем, относительное и абсолютное содержание IFN- $\gamma$ -негативных Т-клеток ( $CD3^+IFN-\gamma^-$ ) у пациентов с ИТЛ находилось в пределах нормальных значений (Таблица 5, Рисунок 11). Группа больных с ДТЛ характеризовалась снижением процентного и абсолютного числа  $CD3^+IFN-\gamma^-$  лимфоцитов относительно показателей в группе контроля (в 1,61 и 1,31 раза соответственно), равно как и больные ИТЛ (в 1,48 и 1,54 раза соответственно).

Таблица 5 – Количество IL-12/IL-27-индуцированных CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитов, позитивных и негативных по внутриклеточному содержанию IFN- $\gamma$ , у здоровых доноров и больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>
	в числителе – в %; в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9$ /л			
Здоровые доноры	34,09 (31,74-39,18)	40,73 (35,39-44,60)	13,84 (6,51-18,17)	11,34 (9,37-12,47)
	0,541 (0,343-0,625)	0,525 (0,486-0,632)	0,171 (0,090-0,293)	0,164 (0,109-0,198)
Больные инфильтративным туберкулезом легких	26,22 (22,30-31,66) $p_1 < 0,001$	37,58 (32,96-41,88)	19,51 (16,74-20,38) $p_1 < 0,001$	16,33 (11,62-21,07) $p_1 < 0,05$
	0,446 (0,249-0,535) $p_1 < 0,05$	0,620 (0,476-0,831)	0,288 (0,188-0,470) $p_1 < 0,001$	0,248 (0,138-0,479) $p_1 < 0,05$
Больные диссеминированным туберкулезом легких	24,79 (18,16-30,24) $p_1 < 0,001$	25,29 (18,24-35,61) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	23,20 (20,61-26,64) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	24,06 (19,73-28,36) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$
	0,366 (0,226-0,526) $p_1 < 0,05$	0,403 (0,252-0,504) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,376 (0,182-0,586) $p_1 < 0,001$	0,404 (0,252-0,574) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$

Примечание –  $p_1$  – уровень статистических различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных инфильтративной формой туберкулеза легких.

Что касается IFN- $\gamma$ -позитивных клеток, не относящихся к классу Т-лимфоцитов (CD3-негативные), то их численность у больных ТЛ, как относительная, так и абсолютная, превышала аналогичные значения в контрольной группе при наибольшей выраженности изменений у пациентов с ДТЛ (Таблица 5, Рисунок 11).

При этом относительное и абсолютное количество дважды негативных лимфоцитов (CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>) превышало контрольные показатели как при ИТЛ, так и при ДТЛ, но в большей степени у пациентов с диссеминированной формой заболевания (Таблица 5, Рисунок 11).

При анализе субпопуляционного состава IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов крови с учетом чувствительности *M. tuberculosis* к препаратам этиотропной терапии во всех группах обследованных лиц с ТЛ было установлено снижение процентного и абсолютного содержания CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> клеток в сравнении с показателями у здоровых добровольцев. Исключением явилась группа больных с инфильтративным ЛУТЛ, относительное и абсолютное количество CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> лимфоцитов у которых не отличалось от нормы (Таблица 6).



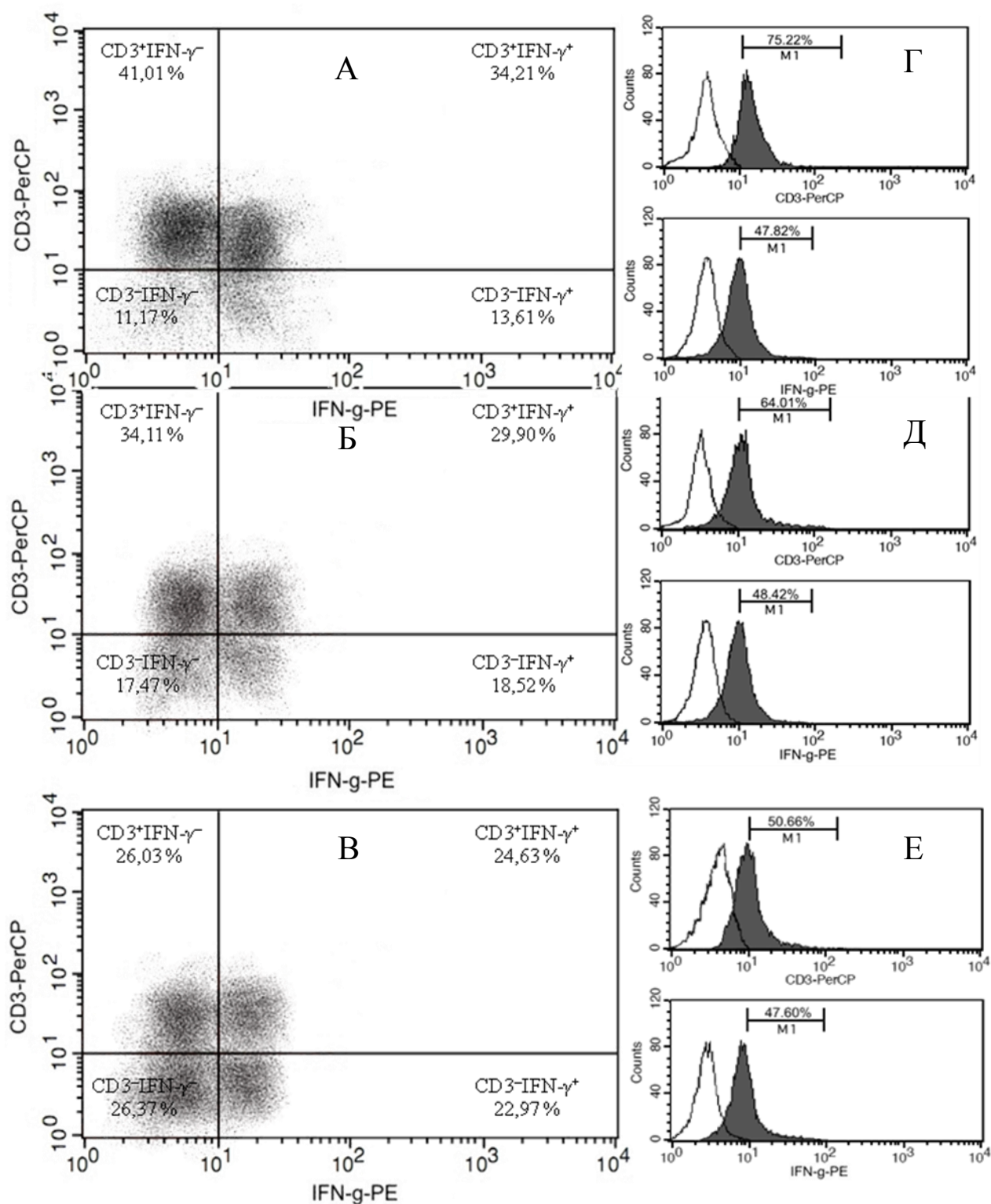


Рисунок 11 – Количество CD3-позитивных клеток, содержащих внутриклеточный IFN- $\gamma$ , после 10-часовой инкубации с индукторами (рекомбинантные IL-12, IL-27) *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких (по данным проточной цитофлуориметрии).

*Примечание* – Данные представлены на примере индивидуальных гистограмм распределения лимфоцитов крови по параметрам флуоресценции при окраске антителами к CD3 (PerCP) и IFN- $\gamma$  (PE) у здорового донора (А) и пациентов с инфильтративным (Б) и диссеминированным (В) туберкулезом легких; Г, Д, Е – изотипический контроль флуоресценции.

Таблица 6 – Количество IL-12/IL-27-индуцированных CD3<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup> лимфоцитов, позитивных и негативных по внутриклеточному содержанию IFN- $\gamma$ , у здоровых доноров и больных туберкулезом легких с учетом лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>
	в числителе – в %; в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9$ /л			
Здоровые доноры	34,09 (31,74-39,18)	40,73 (35,39-44,60)	13,84 (6,51-18,17)	11,34 (9,37-12,47)
	0,541 (0,343-0,625)	0,525 (0,486-0,632)	0,171 (0,090-0,293)	0,164 (0,109-0,198)
Инфильтративный ЛЧТЛ	30,15 (24,01-34,72) $p_1 < 0,05$	33,50 (30,13-35,04) $p_1 < 0,05$	18,26 (14,67-22,18) $p_1 < 0,05$	18,36 (16,76-20,37) $p_1 < 0,001$
	0,452 (0,321-0,524) $p_1 < 0,05$	0,459 (0,376-0,503) $p_1 < 0,05$	0,246 (0,178-0,509) $p_1 < 0,05$	0,299 (0,198-0,445) $p_1 < 0,01$
Инфильтративный ЛУТЛ	25,74 (22,25-31,68) $p_1 < 0,001$	40,03 (37,27-43,47) $p_3 < 0,01$	14,04 (9,35-20,08)	19,64 (16,52-20,39) $p_1 < 0,001$
	0,341 (0,227-0,516) $p_1 < 0,05$	0,644 (0,416-0,932)	0,305 (0,075-0,451)	0,281 (0,188-0,485) $p_1 < 0,001$
Диссеминированный ЛЧТЛ	28,96 (21,68-31,70) $p_1 < 0,05$	31,01 (21,62-35,47) $p_1 < 0,01$	20,21 (16,60-22,73) $p_1 < 0,01$	22,22 (19,54-26,87) $p_1 < 0,001$
	0,406 (0,242-0,536) $p_1 < 0,05$	0,417 (0,256-0,518) $p_1 < 0,05$	0,417 (0,256-0,597) $p_1 < 0,001$	0,320 (0,175-0,533) $p_1 < 0,01$
Диссеминированный ЛУТЛ	23,19 (15,03-24,81) $p_1 < 0,001$	20,75 (16,82-28,62) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$ ; $p_3 < 0,05$	28,35 (25,38-37,14) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$ ; $p_3 < 0,001$	24,56 (21,44-26,40) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$
	0,322 (0,210-0,494) $p_1 < 0,05$	0,384 (0,238-0,500) $p_1 < 0,05$ ; $p_2 < 0,05$	0,384 (0,238-0,550) $p_1 < 0,01$	0,442 (0,330-0,599) $p_1 < 0,001$

*Примечание* – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких;  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри каждой клинической формы).

Относительное и абсолютное количество IFN- $\gamma$ -позитивных лимфоцитов, негативных по CD3 (CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) возрастало у пациентов с диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ, а также у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ. В группе лиц, страдающих инфильтративной формой ЛУТЛ, содержание CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов оставалось в пределах контрольных значений (Таблица 6). Численность дважды негативных лимфоцитов (CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>), как в процентном, так и в абсолютном ее выражении, во всех группах больных ТЛ превышала значения контрольных показателей с наибольшей выраженностью при диссеминированной форме ЛУТЛ (Таблица 6).

Вместе с тем, процентное и абсолютное число всех IFN- $\gamma$ -позитивных клеток у больных ТЛ оставалось в пределах нормальных величин, за исключением показателя в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ, у которых содержание IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов превышало аналогичные показатели как в группе здоровых доноров, так и у пациентов с ТЛ других обследуемых групп (Таблица 7, Рисунок 11).

Таблица 7 – Общее количество IFN- $\gamma$ -позитивных лимфоцитов периферической крови после IL-12/IL-27-индукции *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоциты	
		(в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9/\text{л}$ )	
1		2	
В зависимости от клинической формы туберкулеза легких			
Здоровые доноры		48,66 (45,65-52,13) 0,688 (0,600-0,876)	
Инфильтративный туберкулез легких		45,00 (39,52-47,47) 0,612 (0,444-1,083)	
Диссеминированный туберкулез легких		50,32 (42,18-57,77) 0,862 (0,491-1,088)	
В зависимости от лекарственной чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i>			
Инфильтративный	ЛЧТЛ	48,17 (45,07-50,31) 0,663 (0,563-1,081)	
	ЛУТЛ	46,58 (36,58-51,00) 0,594 (0,346-1,083)	
Диссеминированный	ЛЧТЛ	45,77 (40,15-52,83) 0,791 (0,440-1,095)	

Продолжение таблицы 7

1		2
	ЛУТЛ	52,61 (52,15-59,46) $p_1 < 0,01$ ; $p_2 < 0,001$ ; $p_3 < 0,01$
		0,953 (0,660-1,082) $p_1 < 0,01$

*Примечание* – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких;  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри каждой клинической формы).

Таким образом, течение туберкулезной инфекции сопровождается снижением в крови содержания CD3-позитивных  $IFN-\gamma^+$  и  $IFN-\gamma^-$  лимфоцитов, и напротив, увеличением численности CD3-негативных  $IFN-\gamma^+$  и  $IFN-\gamma^-$  клеток на фоне общей Т-лимфоцитопении. Установленные изменения наиболее ярко выражены в случае диссеминированной формы ЛУТЛ.

### 3.7 Уровень секреции $IFN-\gamma$ в культуре IL-12/IL-27-индуцированных лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких

Результаты исследования спонтанной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции  $IFN-\gamma$  лимфоцитами периферической крови *in vitro* у здоровых добровольцев и больных ТЛ представлены в Таблицах 8 и 9.

Таблица 8 – IL-12/IL-27-индуцированная секреция  $IFN-\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me ( $Q_1$ - $Q_3$ )

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) $p_4 < 0,001$
Инфильтративный туберкулез легких	90,32 (49,00-114,49) $p_1 < 0,001$	200,98 (160,10-253,49) $p_1 < 0,001$ ; $p_4 < 0,001$
Диссеминированный туберкулез легких	95,81 (68,66-127,12) $p_1 < 0,001$	261,60 (202,31-314,07) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,001$

*Примечание* –  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_4$  – с показателями базальной секреции.

В ходе исследования было зафиксировано увеличение спонтанной (базальной) секреции IFN- $\gamma$  у больных инфильтративным и диссеминированным ТЛ в 2,73 и 2,89 раза соответственно относительно показателей в группе здоровых доноров, у которых значение данного показателя в среднем составило 33,11 пг/мл (Таблица 8).

IL-12/IL-27-стимуляция лимфоцитов крови больных ИТЛ и ДТЛ приводила к усилению секреции IFN- $\gamma$  *in vitro* как относительно базального ее уровня (в 2,23 и 2,73 раза соответственно), так и по сравнению с показателем в группе контроля, где отмечалось двукратное увеличение индуцированной IFN- $\gamma$ -секреции относительно ее базального уровня. При этом диссеминированная форма ТЛ характеризовалась более выраженным повышением уровня продукции IFN- $\gamma$  в культуре лимфоцитов, который в 4 раза превышал значения показателя у здоровых доноров и в 1,3 у больных инфильтративной формой заболевания (Таблица 8).

Анализ IFN- $\gamma$ -секретирующей активности Т-лимфоцитов с учетом чувствительности возбудителя заболевания к препаратам этиотропной терапии позволил установить, что у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ отмечалось усиление спонтанной (базальной) и IL-12/IL-27-индуцированной продукции анализируемого цитокина по сравнению с соответствующими параметрами в группе контроля. Обозначенные изменения цитокинопродукции не зависели от варианта заболевания, несмотря на тенденцию к ее увеличению при диссеминированном ЛУТЛ (Таблица 9).

Таблица 9 – IL-12/IL-27-индуцированная секреция IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам, 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
Инфильтративный туберкулез легких	ЛЧТЛ	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
	ЛУТЛ	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
Диссеминированный туберкулез легких	ЛЧТЛ	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
	ЛУТЛ	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 – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких; 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.

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что у больных ТЛ регистрируется гиперсекреция IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* как в спонтанных условиях, так и в условиях направленной IL-12/IL-27-индукции клеток. Максимальные значения продукции анализируемого цитокина отмечаются при диссеминированной форме ТЛ и не зависят от лекарственной чувствительности возбудителя заболевания.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время не вызывает сомнений, что ключевое значение в формировании эффективного иммунного ответа на внедрение *Mycobacterium tuberculosis* играет кооперативное межклеточное взаимодействие, обеспечивающее распознавание, уничтожение и элиминацию возбудителя заболевания из организма [101]. Являясь иммунозависимым заболеванием, туберкулез легких (ТЛ) характеризуется дисрегуляцией иммунных процессов, важную роль в патогенезе которой отводят нарушению структурно-функционального состояния иммунокомпетентных клеток – лимфоцитов и моноцитов [9, 24, 28, 69, 99, 100, 101, 132].

Т-лимфоциты, занимающие несомненное лидерство среди всех лимфоцитов (65-70%, по данным отдельных авторов – до 80%), являются главными клетками-эффекторами иммунного ответа на внутриклеточные патогены. Обладая количественным превосходством, Т-лимфоциты и их цитокины представляют собой многофункциональную сеть, обеспечивающую формирование клеточно-опосредованного иммунного ответа, направленного на уничтожение и удаление возбудителя заболевания. Именно Т-лимфоциты 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. В связи с этим, вероятность развития туберкулеза во многом определяется количеством и функциональным состоянием данной клеточной популяции [27, 34, 39, 99, 182].

С этих позиций нами было исследовано общее количество лейкоцитов, лимфоцитов и Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) в крови. Полученные результаты показали снижение у больных ТЛ относительной и абсолютной численности лимфоцитов и их CD3-позитивной субпопуляции по сравнению с аналогичными показателями у здоровых добровольцев. Абсолютная лимфоцитопения носила наиболее выраженный характер у больных инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) вне зависимости от чувствительности возбудителя к препаратам противотуберкулезной терапии. У

пациентов с диссеминированной формой лекарственно-устойчивого туберкулеза легких (ЛУТЛ) снижение относительного количества лимфоцитов в крови сочеталось с соответствующим норме абсолютным числом клеток данного типа. В то же время абсолютная Т-лимфоцитопения у них была максимальной. У пациентов с инфильтративным ЛУТЛ снижение относительного числа CD3<sup>+</sup> клеток сочеталось с соответствующим норме абсолютным их содержанием. Вместе с тем, во всех группах больных ТЛ отмечался лейкоцитоз (Рисунок 7, 8, 9).

Установленные в работе изменения количественных показателей со стороны лейкоцитарного звена крови, в целом, не противоречат данным литературы. Увеличение ОКЛ при ТЛ, как правило, связывают с увеличением числа нейтрофилов и моноцитов в крови под влиянием факторов воспаления и продуктов распада тканей вследствие перераспределения клеток из маргинального пула в циркуляторное русло, а также мобилизации их костномозгового резерва, активации процессов пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц грануломоноцитопоза. При этом увеличение пула циркулирующих нейтрофилов и моноцитов возможно за счет ускоренного поступления молодых форм клеток из костного мозга в периферическую кровь [68, 83, 89, 91, 92, 95, 181]. Ранняя активация гемопозиндуцирующего микроокружения, участвующего в локальной регуляции кроветворения, в том числе в ответ на действие медиаторов воспаления, также может являться фактором повышения ОКЛ при ТЛ, учитывая, что у всех пациентов отмечался распространенный деструктивный процесс в легких [38]. Кроме того, лейкоцитоз мог быть инициирован прямым действием на гемопозитические клетки-предшественницы продуктов распада ткани легких и вирулентных факторов самого возбудителя инфекции (корд-фактор и др.) [38, 82, 92, 95].

Лимфоцитопения, регистрируемая у больных ТЛ, по-видимому, напрямую связана с уменьшением количества CD3-позитивных клеток крови – субпопуляции, численно преобладающей над другими типами лимфоцитов в норме. Возможными причинами уменьшения пула Т-клеток, в свою очередь, могут являться: прямое действие туберкулезных токсинов на лимфоидную ткань с угнетением ее способности к гиперплазии, что отражается на численности лимфоцитов; длительность латентного периода туберкулезной инфекции, приводящего к перенапряжению иммунитета, и, в конечном итоге, к угнетению лимфоцитопоза [54, 84, 92, 125, 182]. Кроме того, течение



ТЛ, как правило, сопровождается массовой гибелью Т-клеток в очаге воспаления, что способствует их быстрой миграции из циркуляторного русла [66]. Показано, что Т-лимфоциты в большей степени подвержены гибели в результате активации процессов апоптоза. Повышенную чувствительность Т-лимфоцитов к запуску программы клеточной гибели связывают с высокой экспрессией на их поверхности апоптотических FasR- и TNFR1-рецепторов [24, 66, 75, 93, 101, 186]. Активация программы апоптоза в поврежденных под влиянием туберкулезных токсинов клетках может рассматриваться в качестве одного из вероятных патогенетических факторов уменьшения количества Т-лимфоцитов в крови [56, 62, 66, 94]. Особую роль в регуляции Т-клеточной гибели отводят также фактору некроза опухолей (TNF)  $\alpha$  – ключевому регуляторному цитокину противотуберкулезного иммунного ответа [5, 69, 101, 124, 133, 234]. Показана способность *M. tuberculosis* индуцировать гиперсекрецию TNF- $\alpha$ , что в условиях туберкулезной инфекции может иметь негативные последствия в связи с TNF- $\alpha$ -опосредованной гибелью лимфоцитов и развитием Т-клеточного дефицита [27, 34, 69, 181, 186, 206, 211]. Ярко выраженный дисбаланс со стороны эндокринной системы, регистрируемый у большинства больных ТЛ, вероятно, также вносит свой вклад в снижение численности CD3-позитивной субпопуляции лимфоцитов. Так, показано, что у больных ТЛ отмечается повышенное образование гормонов надпочечников, обладающих выраженным лимфоцитопеническим действием [42, 43, 54].

Таким образом, наличие распространенного деструктивного процесса в легких при туберкулезной инфекции сопровождается лимфоцитопенией, Т-лимфоцитопенией и лейкоцитозом. Пониженное содержание лимфоцитов и их CD3-позитивной субпопуляции в крови у больных ТЛ в большинстве случаев носит абсолютный характер. Выраженность лимфоцитопении определяется клинической формой ТЛ (инфильтративный, диссеминированный) и его вариантом (лекарственно-устойчивый, лекарственно-чувствительный). Наиболее неблагоприятным является сочетание диссеминированной формы ТЛ и лекарственной устойчивости возбудителя заболевания.

В настоящее время установлено, что ТЛ характеризуется угнетением Т-клеточного звена иммунитета, что проявляется снижением не только численности, но и, как правило, пролиферативной и секреторной активности Т-лимфоцитов [27, 34, 42, 43]. Изучение цитокинсекреторной активности Т-лимфоцитов при туберкулезе оправдано в связи со способностью данной клеточной субпопуляции продуцировать основные

медиаторы иммунного ответа на *M. tuberculosis*, в том числе IFN- $\gamma$ , с которым связывают развитие ряда механизмов антимикобактериальной защиты [101, 211]. Интерес к IFN- $\gamma$  при туберкулезной инфекции, в первую очередь, связан со способностью данного цитокина активировать моноциты/макрофаги, дендритные клетки (DC) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), оказывая влияние на формирование клеточного иммунитета. Показано, что под действием IFN- $\gamma$  происходит дифференцировка моноцитов в эффекторные клетки, активируются нейтрофилы, усиливается фагоцитоз и бактерицидная активность фагоцитов за счет индукции синтеза цитозольных компонентов НАДФН-зависимой оксидазы; активируется синтез макрофагального протеина NRAMPI, повышающего резистентность макрофагов к внутриклеточным микроорганизмам. Помимо этого, под влиянием IFN- $\gamma$  на антигенпрезентирующих клетках усиливается экспрессия таких компонентов комплекса рекогниции липополисахаридов, как TLR4, TLR2, CD14 и т.п. Именно IFN- $\gamma$  играет ведущую роль в генезе гранулемы, индуцированной *M. tuberculosis*, посредством усиления экспрессии адгезивных молекул и хемокинов, необходимых для привлечения моноцитов и макрофагов в очаг воспаления [1, 38, 94, 101, 211].

Известно, что основными клетками-продуцентами IFN- $\gamma$  в иммунном ответе на *M. tuberculosis* являются активированные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты-хелперы (Th). Именно Th1-лимфоцитарный синтез IFN- $\gamma$ , по мнению ряда авторов, обеспечивает «полноценность» эффекторной стадии антимикобактериального иммунного ответа [1, 38, 211]. Однако до настоящего момента нет четкого представления о секреции IFN- $\gamma$  при туберкулезной инфекции, т.к. результаты, представленные в научной литературе, носят противоречивый характер: в одних случаях регистрируется повышенная продукция IFN- $\gamma$ , в других – его недостаточность. Чем обусловлена такая разница в представленных результатах, и каковы молекулярные механизмы нарушения IFN- $\gamma$ -продукции – вопрос, который требует детального рассмотрения. При этом нет четкого понимания того, как связана секреция IFN- $\gamma$  с клинической формой заболевания и лекарственной чувствительностью возбудителя и имеются ли принципиальные отличия в иммунопатогенезе отдельных клинико-патогенетических вариантов туберкулезной инфекции, позволяющие использовать уровень продукции цитокина в качестве прогностического признака.

Учитывая изложенное, в настоящем исследовании был проанализирован уровень

спонтанной и стимулированной секреции IFN- $\gamma$  в условиях направленной Th1-индукции лимфоцитов *in vitro*. Использование в качестве Th1-индукторов рекомбинантных интерлейкинов (IL) 27 и IL-12 обусловлено известными механизмами цитокин-зависимой активации Th1-лимфоцитов при формировании Т-клеточного иммунного ответа (Рисунок 2, 3).

Исходя из данных, полученных при оценке численности CD3-позитивной субпопуляции лимфоцитов (Рисунок 9), снижение количества CD3<sup>+</sup> клеток должно было бы негативно отразиться на выработке IFN- $\gamma$  в условиях IL-12/IL-27-индукции *in vitro* ввиду снижения основной массы потенциальных IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток. Однако исследование цитокинсекреторной активности выявило гиперсекрецию IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* у больных ТЛ как в спонтанных условиях, так и в случае IL-12/IL-27-индукции клеток, наиболее выраженную при диссеминированном ТЛ независимо от варианта лекарственной устойчивости возбудителя (Таблица 6, 7). Таким образом, у больных ТЛ отмечается гиперсекреция IFN- $\gamma$  на фоне общей Т-лимфоцитопении.

Одной из вероятных причин повышения секреции IFN- $\gamma$  при дефиците CD3<sup>+</sup> лимфоцитов может быть увеличение активности компонентов сигнального JAK-STAT-пути, отвечающего за синтез IFN- $\gamma$  в Т-клетках.

Известно, что среди путей индукции синтеза и секреции IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами особое место занимает IL-12-опосредованная сигнальная трансдукция активационного стимула, основным моментом которой является запуск внутриклеточного сигнального пути JAK-STAT. При этом обязательным условием стимуляции Th1-лимфоцитов, опосредованной IL-12, является индуцибельная экспрессия Th1-лимфоцитами  $\beta$ 2-субъединицы рецептора к IL-12 (IL-12R $\beta$ 2), которая обеспечивается активацией транскрипционного фактора T-bet в каскаде реакций сигнального JAK1/TYK2-STAT1-пути, запускаемого IL-27 (Рисунок 2, 3). Только после экспрессии IL-12R $\beta$ 2 (субъединица  $\beta$ 1 рецептора к IL-12 конституционно представлена на покоящихся Т-лимфоцитах) 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/TYK2-STAT4, следствием чего является экспрессия гена *INFG* и секреция контролируемого им цитокина. Параллельно с этим происходит повторная IL-12-опосредованная активация транскрипционного фактора T-bet в каскаде

реакций JAK2/ТYK2-STAT4-сигналинга, которая позволяет поддерживать секрецию IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами на максимально необходимом уровне [9, 44, 52, 107, 135, 165, 177, 179, 203, 217, 219, 227].

Таким образом, секреция IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами во многом определяется активностью тирозиновых янус-киназ (JAK1, JAK2, ТYK2) и факторов транскрипции (STAT1, STAT4, T-bet), являющихся ключевыми компонентами сигнального каскада JAK-STAT, их количеством, способностью активироваться под влиянием цитокиновых стимулов (в частности IL-12 и IL-27) и обеспечивать экспрессию гена *IFNG*. Тем не менее, до настоящего времени вопрос о существовании внутриклеточных механизмов, приводящих к изменению IFN- $\gamma$ -продуцирующей активности Th-клеток при ТЛ, остается неизученным.

В связи с этим нами была проведена оценка содержания активных форм (р-) тирозиновых киназ (JAK1, JAK2, ТYK2) и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах лимфоцитов у больных ТЛ с определением количества T-bet<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>) и IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, а также общего числа всех IFN- $\gamma$ -синтезирующих клеток (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) в условиях IL-12/IL-27-индукции *in vitro*.

Как показали результаты проведенного исследования, у всех больных ТЛ, независимо от клинической формы и варианта заболевания, было зарегистрировано снижение содержания активных форм тирозиновых киназ р-JAK1, р-JAK2, р-ТYK2 и факторов транскрипции р-STAT1 и р-STAT4 в лизатах лимфоцитов крови относительно соответствующих показателей у здоровых доноров (Таблица 8, 9). Кроме того, во всех группах обследованных лиц с туберкулезной инфекцией отмечалось снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов, наиболее выраженное при диссеминированном ЛУТЛ, а также увеличение количества CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup> клеток в случае инфильтративного ЛУТЛ (Таблица 5, Рисунок 11). Наряду с этим, у больных ТЛ регистрировались изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов, проявляющиеся снижением абсолютной и относительной численности CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> клеток на фоне увеличения количества CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> лимфоцитов. Наиболее ярко обозначенные изменения были представлены в группе больных с диссеминированной формой ЛУТЛ. Исключением из общей картины выявленных нарушений явилось содержание IFN- $\gamma$ -негативных (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>) Т-клеток и CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов при инфильтративном ЛУТЛ, относительное и абсолютное количество которых не

отличалось от нормы (Таблица 2, 3; Рисунок 10). Что касается общего содержания IFN- $\gamma$ -позитивных лимфоцитов, то их численность увеличивалась только в случае диссеминированного ЛУТЛ; в других группах пациентов с ТЛ численность IFN- $\gamma^+$  клеток была сопоставимой с нормой (Таблица 4).

Одним из механизмов снижения содержания p-JAK1, p-JAK2, p-TYK2 и активируемых ими p-STAT1 и p-STAT4 в лимфоцитах при направленной IL-12/IL-27-индукции у больных ТЛ может являться нарушение процессов, связанных с экспрессией IL-12R $\beta$ 2 на поверхности Т-клеток. Среди них, как правило, выделяют: дефицит активирующих цитокинов; изменение в рецепторном аппарате Т-лимфоцитов, связанное с дисбалансом рецепторных молекул; дефицит сигнальных молекул (в том числе их неактивных предшественников). Учитывая, что исследования проводились с использованием в качестве индукторов рекомбинантных цитокинов IL-12 и IL-27 в адекватных (иммунологических) дозах, то версию о дефиците активирующих цитокинов можно исключить. С другой стороны, недавними исследованиями продемонстрировано, что IL-27 способен как индуцировать дифференцировку Th1-клеток, так и проявлять противовоспалительные свойства [144, 159, 172, 175]. Среди последних отмечают способность IL-27 индуцировать IL-10-секреторную активность Т-регуляторных лимфоцитов, а именно Tr1-клеток. Передача сигналов от IL-27 в Tr1-лимфоцитах приводит к активации трех ключевых компонентов, необходимых для их дифференцировки – транскрипционного фактора c-Maf, IL-21 и рецептора ICOS (inducible costimulator). Фактор c-Maf является основным, его активация посредством IL-27 приводит к секреции IL-21, который, действуя как аутокринный фактор, стимулирует пролиферацию Tr1-клеток. Экспрессия ICOS способствует IL-27-зависимой дифференцировке Tr1 и продукции ими IL-10 [159, 205]. Показано, что IL-10 в комплексе с IL-27 может ингибировать активность Th1-лимфоцитов и препятствовать активации наивных Т-клеток [161, 187, 222].

Еще более вероятным представляется вариант нарушений, связанный с изменением в рецепторном аппарате Т-лимфоцитов, в частности, нарушение экспрессии рецептора к IL-27. Как известно, рецептор к IL-27 в своем строении представлен двумя субъединицами – WSX-1 и gp130. При этом молекуле WSX-1, экспрессируемой наивными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками, в норме отводят роль ингибитора пролиферации Т-лимфоцитов [38, 160, 161]. Следовательно, высокая экспрессия молекулы WSX-1 на

поверхности Т-клеток может играть негативную роль в активации Th1-лимфоцитов, ингибируя первый на этапе активации Т-клеток JAK1/ТYK2-STAT1-сигнальный путь, запускаемый IL-27, приводя к снижению концентрации его активных компонентов p-JAK1, p-ТYK2 и фактора транскрипции p-STAT1. Дефицит второй субъединицы рецептора к IL-27 – gp130 может сказаться на формировании полноценного (в функциональном плане) рецептора, что ведет к ингибированию активационных сигналов от IL-27. Косвенно на нарушение gp130-рецепции с последующим нарушением активации Т-лимфоцитов может указывать выявленная нами положительная взаимосвязь между концентрацией p-ТYK2 и содержанием активной формы транскрипционного фактора STAT1 в лизатах лимфоцитов у больных инфильтративным ЛУТЛ ( $r=0,76$ ,  $p<0,01$ ), учитывая, что именно молекула gp130 обеспечивает активацию тирозинкиназы ТYK2 и проведение активационного сигнала. Результатом такого ингибирования может стать нарушение активации транскрипционного фактора T-bet и низкая, вследствие этого, экспрессия рецепторной субъединицы IL-12R $\beta$ 2. В свою очередь, низкая экспрессия IL-12R $\beta$ 2 на Т-лимфоцитах у больных ТЛ препятствует реализации активационных эффектов IL-12, что приводит к снижению концентрации активных компонентов второго активационного пути JAK2/ТYK2-STAT4, а, следовательно, к нарушению активации Th1-лимфоцитов в целом. Установленная положительная корреляционная взаимосвязь между концентрацией p-ТYK2 и содержанием активной формы транскрипционного фактора STAT4 у больных инфильтративным ( $r=0,67$ ,  $p<0,05$ ) и диссеминированным ( $r=0,82$ ,  $p<0,01$ ) ЛУТЛ является еще одним косвенным доказательством справедливости данного предположения. Именно нарушением в рецепторном аппарате Т-лимфоцитов, в первую очередь, можно объяснить снижение концентрации p-JAK1, p-JAK2, p-ТYK2 и факторов транскрипции p-STAT1, p-STAT4, а также уменьшение числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов, установленное в настоящем исследовании (Таблица 5).

Кроме того, не исключено снижение числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов, концентрации активных форм тирозиновых киназ и факторов транскрипции STAT в лизатах лимфоцитов крови у больных ТЛ вследствие угнетения процессов биосинтеза белка, регистрируемого при туберкулезной инфекции [65].

Количественное снижение активных компонентов JAK-STAT-сигнальных путей, включая дефицит активной формы транскрипционного фактора T-bet, должно, на наш

взгляд, негативно отражаться на цитокинсекреторной активности Т-лимфоцитов, в частности секреции IFN- $\gamma$  Th1-лимфоцитами. Однако установленное в настоящем исследовании увеличение спонтанной и IL-12/IL-27-индуцированной секреции IFN- $\gamma$  во всех группах больных ТЛ не согласуется с полученными данными по содержанию CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов и концентрации активных форм янус-киназ и белков STAT в лизатах клеток (Таблица 6, 7).

Увеличение секреции IFN- $\gamma$  лимфоцитами крови *in vitro* на фоне снижения активности ключевых компонентов основного пути активации его синтеза позволяет предположить, что гиперсекреция анализируемого цитокина, скорее всего, связана не с Th1-клетками, а с усилением цитокин-продуцирующей активности других (CD3-негативных) лимфоцитов, в частности NK-клеток, имеющих отличительный от Т-лимфоцитов-хелперов IL-12-опосредованный путь активации, приводящий к экспрессии гена IFN- $\gamma$  [1, 10, 38, 87, 128, 135, 199, 220]. Продемонстрирована способность NK-лимфоцитов активироваться в присутствии IL-12 без участия IL-27, что, вероятнее всего, связано с экспрессией на их поверхности полноценного рецептора к IL-12, взаимодействие которого с одноименным цитокином напрямую приводит к активации STAT4 и синтезу IFN- $\gamma$ . Параллельно с этим, IL-27 через фактор STAT1 запускает активацию транскрипционного фактора T-bet и индукцию последним секреции IFN- $\gamma$  [169, 177, 220]. Таким образом, NK-клетки способны отвечать повышенной продукцией IFN- $\gamma$  на IL-12/IL-27-стимуляцию в значительно более короткий, в отличие от Th1-лимфоцитов, период времени. Учитывая то, что численность NK-клеток в культуре лимфоцитов является малочисленной, активация компонентов их JAK-STAT-сигналинга на фоне дефицита аналогичных молекул в Т-лимфоцитах, по всей видимости, не оказывает существенного влияния на концентрацию активных форм исследуемых янус-киназ и белков STAT, содержание которых в лизатах лимфоцитов крови у больных ТЛ было пониженным.

Увеличение численности NK-лимфоцитов, сопряженное с усилением их IFN- $\gamma$ -продукции, при ТЛ показано во многих исследованиях [1, 60, 74, 78, 94, 134]. Подтверждением этому является зарегистрированное в настоящем исследовании увеличение относительного и абсолютного числа CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> клеток в крови у больных ТЛ. Вероятно, усиление секреторной активности NK-клеток происходит с целью компенсации функциональной недостаточности Т-хелперов типа 1 – основных

эффекторов противотуберкулезного иммунитета. Однако есть мнение, что вырабатываемый NK-клетками IFN- $\gamma$  не обладает эффектами своего Th-лимфоцитарного гомолога и не индуцирует Th1-клетки [38, 134]. Так, А. Kupz и соавторы [134], проанализировав на мышах модели инфекций с внутриклеточным паразитированием возбудителей, пришли к выводу, что усиление IFN- $\gamma$ -продуцирующей активности NK-клеток связано с компенсацией дефицита других клеток, секретирующих IFN- $\gamma$ , главным образом, Th1-лимфоцитов. По мнению авторов, гиперсекреция интерферона NK-клетками в данном случае направлена на торможение размножения возбудителей в фагоцитах, не оказывая при этом стимулирующего влияния на Th1-лимфоциты [134].

В то же время, избыток IFN- $\gamma$ , продуцируемого NK-клетками, может негативно отразиться на активации Th1-лимфоцитов ввиду его способности индуцировать экспрессию белков-супрессоров цитокиновой сигнализации в Т-клетках, основной функцией которых является блокирование передачи сигнала от цитокиновых рецепторов к белкам 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 [51, 107, 192, 202].

Наиболее изученной на сегодняшний день группой белков-супрессоров, с повышенной активностью которых может быть связан дефицит фосфорилированных форм тирозиновых киназ JAK1, JAK2, TYK2 и транскрипционных факторов STAT1, STAT4 в Т-лимфоцитах, являются SOCS-белки. Данные белки играют важную роль в регуляции иммунной системы, обеспечивая контроль над передачей цитокинового сигнала по JAK-STAT-сигнальному пути в ядро клетки. Являясь классическими ингибиторами, действующими по механизму отрицательной обратной связи, SOCS-белки способны быстро активироваться в ответ на цитокиновую стимуляцию. Кроме центрального SH2-домена (цитокин-индуцируемый «SRC homology 2» домен) SOCS-белки имеют в своем составе С-концевую гомологичную область, называемую «SOCS-box», которая обеспечивает связывание с компонентами убиквитин-Е3-лигазного комплекса, обеспечивая участие SOCS в протеасомном пути деградации белков (протеасомном каскаде) в качестве «презентирующего» агента. Механизм супрессии передачи сигнала через JAK-STAT-каскад может быть опосредован как конкурентным связыванием белков SOCS с JAK, предотвращая соединение STAT с рецептором, так и



убиквитинированием различных компонентов JAK-STAT пути, что приводит к их посттрансляционной модификации и последующей деградации в протеасомах. Сигналом, запускающим протеасомную деградацию, является фосфорилирование SOCS рецептор-ассоциированными JAK, которые в свою очередь активируются через цитокиновые сигналы. Так, под действием SOCS3-белка происходит ингибирование IL-12-индуцированной Th1-дифференцировки. CIS-белок – еще один представитель SOCS-семейства, не влияет на янус-киназы, а способен ингибировать STAT-белки, конкурируя с рецепторными сайтами [51, 192, 202, 216].

Семейства белков-супрессоров SLIM, PIAS и Hlx являются малоизученными, известно лишь, что механизм их действия схож с таковым для белков SOCS. Так, ингибиторы внутриклеточной сигнальной трансдукции SLIM являются убиквитин-лигазами, белки семейства PIAS подвергают компоненты JAK-STAT пути сумоилированию, представляющему собой вариант посттрансляционной модификации в виде ковалентного присоединения белка SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) к лизину белков-субстратов за счет серии ферментативных реакций. Модифицированные подобным образом янус-киназы и транскрипционные факторы в дальнейшем подвергаются протеасомной деградации. Известно, что белки-супрессоры Hlx ускоряют дефосфорилирование и протеасомное разрушение STAT4 в Th1-клетках. Считается, что Hlx неспособны непосредственно связываться с фосфорилированными тирозином активными формами STAT4. Вероятно, Hlx привлекает для этого другие цитоплазматические фосфатазы или «отдаляет» p-STAT4 от их ДНК-последовательностей в сторону фосфатаз, находящихся непосредственно в ядре [107].

Очевидно, что IFN- $\gamma$ , продуцируемый NK-клетками в высоких дозах, по принципу отрицательной обратной связи может индуцировать экспрессию белков-супрессоров и, тем самым, влиять на активность компонентов JAK-STAT-сигнализации, «блокируя» их активацию, что приводит к снижению содержания их активных форм. В пользу данного утверждения может служить выявленная в настоящем исследовании отрицательная корреляционная взаимосвязь между количеством активного транскрипционного фактора STAT4 и уровнем продукции IFN- $\gamma$  у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ ( $r=0,56$ ;  $p<0,05$ ). Таким образом, в данном случае IFN- $\gamma$ , вероятно, выступает в качестве ингибитора активации Th1-лимфоцитов.

Вместе с тем, имеются предположения, что продуцируемый NK-клетками IFN- $\gamma$

способен оказывать индуцирующее влияние на активность Т-регуляторных клеток (Treg). Кроме того, в современной литературе имеются данные о секреции IFN- $\gamma$  самими Treg-лимфоцитами [9, 137, 156, 225, 238].

Согласно существующим представлениям, Т-регуляторные клетки подразделяют на естественные и адаптивные. Первые дифференцируются в процессе нормального, естественного развития организма вне зависимости от антигенной стимуляции, вторые формируются в ходе иммунного ответа [9, 20, 21, 101, 238]. Именно адаптивным Treg отводят важное место в иммунном ответе макроорганизма на микобактериальную инвазию за счет широкого спектра эффектов данной субпопуляции лимфоцитов, в том числе за способность секретировать IFN- $\gamma$ .

Считается, что IFN- $\gamma$ , как и многие другие цитокины, обладает плеiotропной активностью, за что его и называют иммунорегуляторным цитокином [101, 194, 200]. Явление плеiotропизма для IFN- $\gamma$  заключается в его способности при определенных условиях выступать в качестве ключевого звена Th1-опосредованного иммунного ответа (провоспалительный эффект), с одной стороны, с другой – выступать в качестве индуктора для адаптивных Treg, опосредующих контроль над развивающейся инфекцией (противовоспалительный эффект). Установлено, что активация Treg может приводить к быстрой продукции последними значительных количеств IFN- $\gamma$  [9, 69, 156, 238]. Учитывая, что при ТЛ отмечается увеличение числа и функциональной активности Treg-клеток [9, 76, 123, 164], можно предположить, что данная субпопуляция Т-лимфоцитов вносит значительный вклад в гиперсекрецию IFN- $\gamma$  и угнетение основных компонентов IL-12-опосредованного JAK-STAT-сигналинга в Th1-клетках. Данный механизм, предполагающий увеличение содержания и IFN- $\gamma$ -продуцирующей активности Treg-клеток, вероятно, в первую очередь, характерен для инфильтративной формы ТЛ в сочетании с лекарственной устойчивостью возбудителя инфекции к действию противотуберкулезных препаратов. Так, на фоне резкого снижения числа CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов и гиперсекреции IFN- $\gamma$  у больных инфильтративным ЛУТЛ регистрировалось нормальное (относительно контрольных значений) абсолютное содержание всех CD3- и IFN- $\gamma$ -позитивных лимфоцитов, в число которых входят и Treg-клетки (Таблица 4, 5, Рисунок 9). При этом увеличения численности CD3<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоцитов, в число которых входят НК-лимфоциты, не отмечалось (Таблица 3). Это позволяет сделать предположение об увеличении численности и функциональной

активности Treg-клеток и их вклада в гиперсекрецию IFN- $\gamma$  при данной форме ЛУТЛ. Пониженное содержание CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов, характеризующее в условиях IL-12/IL-27-индукции снижение численности Т-лимфоцитов-хелперов типа 1, позволяет в данном случае не принимать во внимание продукцию IFN- $\gamma$  активированными цитотоксическими Т-лимфоцитами, учитывая, что их активация и пролиферация зависят от присутствия IL-2, продуцируемого Th1-клетками.

Кроме того, К. Wood и В. Sawitzki [238] предложили модель, согласно которой, IFN- $\gamma$ , секретируемый на ранней стадии иммунного ответа индуцированными Treg-лимфоцитами, способен ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток, экспрессирующих полноценный рецептор IFN- $\gamma$  (субъединицы IFNGR1 и IFNGR2). При этом основной противовоспалительный эффект IFN- $\gamma$  заключается не только в ингибции Т-клеточной пролиферации, но и в индукции программы апоптоза Т-клеток. Важно отметить, что только наивные (Th0) и Th2-лимфоциты чувствительны к IFN- $\gamma$ -опосредованному апоптозу за счет экспрессии на своей поверхности обеих цепей рецептора цитокина. В процессе дифференцировки зрелые Th1-эффекторные лимфоциты теряют способность к экспрессии сигнальной IFNGR2-цепи, тем самым обеспечивая проведение в клетку частичного апоптогенного сигнала через цепь IFNGR1, их пролиферация продолжается, однако процесс протекает значительно медленнее и эффекторные функции клеток выражены слабее. Активацией IFN- $\gamma$ -секреторной активности Treg-лимфоцитов и запуском процессов IFN- $\gamma$ -опосредованного апоптоза в Th1-клетках, вероятно, можно объяснить снижение численности CD3-позитивной популяции клеток, и их CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> субпопуляций при ТЛ, в особенности при диссеминированной форме ЛУТЛ, при которой обозначенные изменения были наиболее выраженными.

Вместе с тем, ингибирование процессов активации Th1-лимфоцитов может быть связано со способностью Treg-лимфоцитарного IFN- $\gamma$  влиять на активность белков-супрессоров в Th1-клетках. Помимо IFN- $\gamma$  на активность системы ингибиторных белков в Т-клетках могут оказывать влияние другие супрессорные цитокины (TGF- $\beta$ , IL-10), продуцируемые Treg-клетками [9, 21, 23, 39, 69, 72, 74, 77, 81, 101, 212].

В научной литературе последних лет имеются также данные о существенном вкладе в иммунный ответ против *M. tuberculosis* НКТ-клеток, обладающих свойствами как Т-лимфоцитов, так и натуральных киллеров, и способностью продуцировать IFN- $\gamma$

[111, 198]. Однако, рассуждая о вкладе Treg и NKT-клеток в гиперсекрецию IFN- $\gamma$ , важно помнить, что они, как и Th1-лимфоциты, имеют иммунофенотип CD3<sup>+</sup> и, следовательно, мы лишь условно можем говорить о снижении активности Th1-лимфоцитов на фоне увеличения функциональной активности Treg-лимфоцитов и NKT-клеток.

Таким образом, у пациентов с ТЛ отмечается гиперсекреция IFN- $\gamma$  на фоне дефицита основных компонентов внутриклеточного JAK-STAT-сигналинга, принимающих непосредственное участие в активации IFN- $\gamma$ -кодирующих генов, а также дефицита ключевых клеток-продуцентов анализируемого цитокина, которыми являются Th1-лимфоциты. При этом более выраженные иммунологические нарушения характерны для диссеминированного ЛУТЛ.

Известно, что лекарственно-устойчивый ТЛ сопровождается дисбалансом более широкого спектра количественных параметров иммунного статуса, чем лекарственно-чувствительный вариант инфекции. Скорее всего, это обусловлено своеобразным иммунологическим торможением, сопряжённым с возникновением сбоя в работе иммунной системы на фоне избыточного накопления антигена [27, 34, 45, 56, 61, 62, 94, 173]. Активация иммуносупрессорных факторов, главным образом, за счет увеличения численности Т-регуляторных клеток и продуцируемых ими цитокинов, способствует формированию Т-клеточной гипо- и анергии и снижению численности CD3-позитивной популяции лимфоцитов за счет инициации процессов апоптоза [55, 28].

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 [28, 55, 78, 92, 146, 163]. Следовательно, сочетание диссеминированной формы ТЛ и лекарственной

устойчивости возбудителя является неблагоприятным и усугубляет течение заболевания, с одной стороны, развитием анергии Th1-клеток, индуцированной возбудителем с определенными биологическими свойствами, с другой – Th1/Th2-дисбалансом [33, 55, 84, 91, 94, 146, 163].

В целом, 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 12).

В целом, полученные данные, несомненно, расширяют накопленные научные знания об иммунопатогенезе туберкулеза легких и, возможно, внесут весомый вклад в более детальное его понимание, а также в прогнозирование и лечение туберкулезной инфекции.

## Mycobacterium tuberculosis

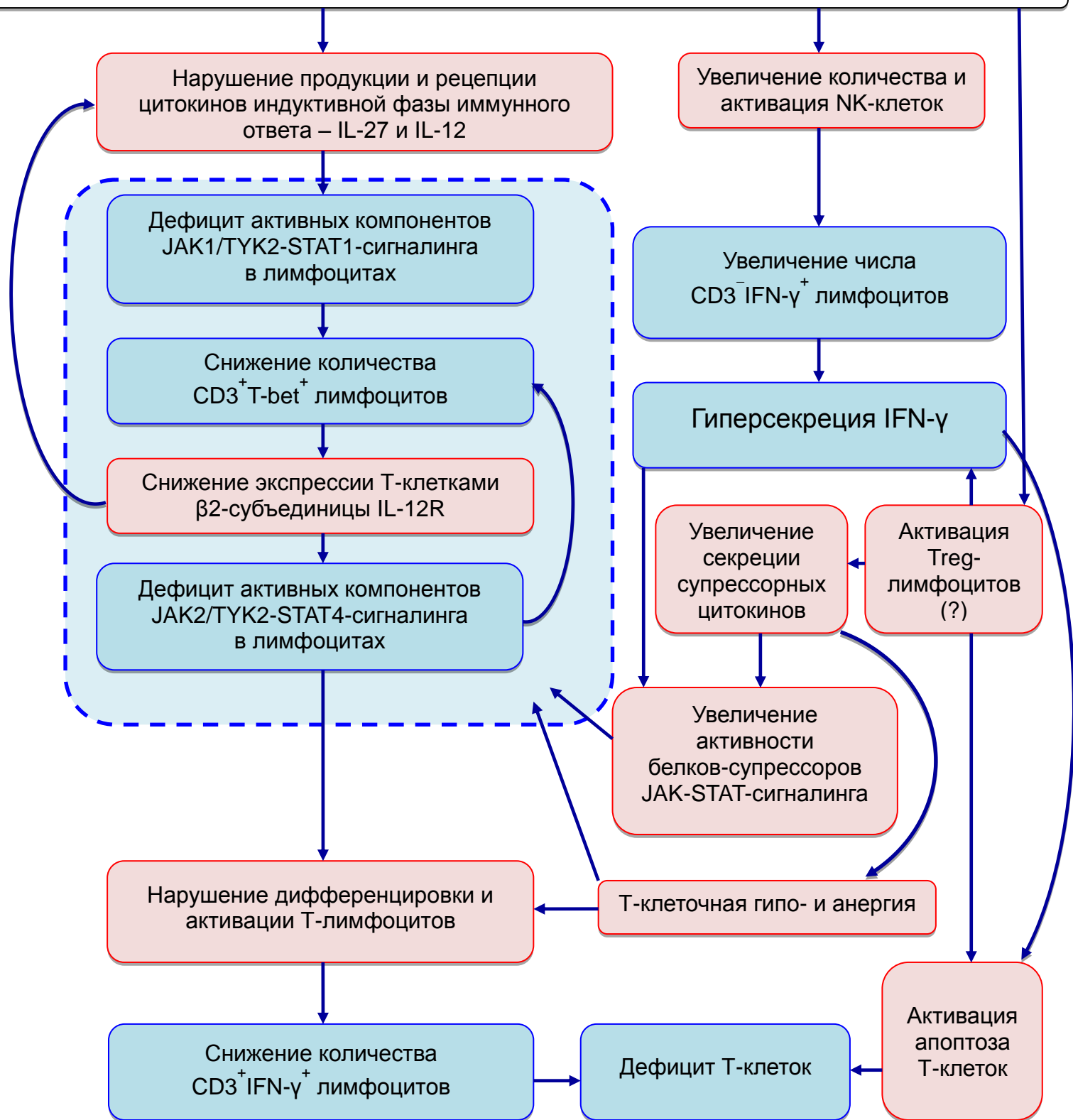


Рисунок 12 – Механизмы нарушений IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов крови при туберкулезе легких по данным литературы и результатам собственных исследований (выделено голубым цветом).

## 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  $CD3^+$  клеток и IL-12/IL-27-индуцированных  $IFN-\gamma^+$  и  $T-bet^+$  Т-лимфоцитов в сочетании с увеличением количества  $IFN-\gamma$ -синтезирующих  $CD3^-$  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 ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких
- ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких
- ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких
- МКАТ – моноклональные антитела
- ОКЛ – общее количество лейкоцитов
- ТЛ – туберкулез легких
- ТМБ – тетраметилбензидин
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- AP-1 – activator protein 1 – активирующий протеин 1
- APC – antigen-presentation cell – антигенпрезентирующая клетка
- CD – cluster of differentiation – кластер дифференцировки
- CR – cell receptor – клеточный рецептор
- CTL – cytotoxic T lymphocyte – цитотоксический Т-лимфоцит
- DC – dendritic cell – дендритная клетка
- FcR – phagocytic cell receptor – рецептор фагоцитирующей клетки
- FITC – fluorescein isothiocyanate – флуоресцеина изотиоционат
- GAF – gamma activated factor –  $\gamma$ -активированный фактор
- GATA-3 – trans-acting T-cell-specific transcription factor 3 – специфический транскрипционный фактор активации Т-лимфоцитов 3
- GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- HO-1 – hemeoxygenase-1 – гемоксигеназа-1
- IDO – indoleamine-2,3-dioxygenase – индолеамин-2,3-диоксигеназа
- IFN – interferon – интерферон
- Ig – immunoglobulin – иммуноглобулин

IL – interleukin – интерлейкин

iNOS – inducible nitric oxide synthase – индуцибельная синтаза оксида азота

JAK – janus kinase – тирозинкиназа семейства Janus

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости

MyD88 – myeloid differentiation primary response gene – адаптерный белок 88

NFAT – nuclear factor of activated T cells – ядерный фактор активированных Т-клеток

NF-κB – nuclear factor κB – ядерный транскрипционный фактор κB

NK – natural killer – натуральный киллер

NO – nitric oxide – оксид азота

PerCP – peridinin-chlorophyll protein – перидинин-хлорофилл протеин

PIAS – protein inhibitor of activated STAT – протеиновый ингибитор активированных STAT

PTP – protein tyrosine phosphatase – протеиновая тирозинфосфатаза

PE – phycoerythrin – фикоэритрин

SCID – severe combined immune deficiency – тяжелый комбинированный иммунодефицит

SOCS – suppressor of cytokine signaling – супрессор цитокиновой сигнализации

STAT – signal transducer and activator of transcription – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции

TAD – transcriptional activation domain – домен, активирующий транскрипцию

TCR – T cell receptor – Т-клеточный рецептор

TGF – transformed growth factor – трансформирующий фактор роста

Th – T-helper – Т-хелпер

TLR – Toll-like receptor – Toll-подобный клеточный рецептор

TNF – tumor necrosis factor – фактор некроза опухолей

TRAF – tumor necrosis factor receptor-associated factor – фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей

ТYK – 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

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абатуров, А.Е. Роль интерферонов в защите респираторного тракта. Часть 1. Каскад возбуждения системы интерферонов / А.Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2007. – Т. 5, № 8. – С. 93–101.
2. Активация транскрипционных факторов STAT5 и STAT3 при запуске пролиферации Т-лимфоцитов человека различными митогенными агентами / И.А. Карицкая, Н.Д. Аксенов, В.В. Зенин и др. // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 1. – С. 42–49.
3. Апоптозиндуцирующее действие противотуберкулезных препаратов основного ряда *in vitro* / О.А. Васильева, В.А. Серебрякова, О.И. Уразова и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55, № 11. – С. 25–29.
4. Ахматова, Н.К. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противоифекционный / Н.К. Ахматова, М.В. Киселевский. – М. : Практическая медицина, 2008. – 256 с.
5. Биктасова, А.К. Роль белков-регуляторов программированной клеточной гибели в реализации проапоптотического эффекта фактора некроза опухоли альфа на лимфоциты крови : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.К. Биктасова. – Новосибирск, 2010. – 25 с.
6. Боровиков, В.П. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере : для профессионалов / В.П. Боровиков. – 2-е изд. – СПб. : Питер, 2003. – 688 с.
7. Бронштейн, И.Н. Справочник по математике для инженеров и учащихся вузов : учебное пособие / И.Н. Бронштейн, К.А. Семендяев. – СПб. : Лань, 2009. – 608 с.
8. Воронкова, О.В. Этиология и иммунопатогенез туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / О.В. Воронкова. – Томск, 2006. – 38 с.
9. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких. Иммунодиагностика и иммунотерапия / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. – Томск : Печатная мануфактура, 2013. – 84 с.
10. Гамма-интерферон: обоснование и перспективы применения в инфекционной практике / Т.В. Сологуб, Е.В. Эсауленко, Э.Г. Деева, И. Йолла // Медлайн. –

2006. – Т. 186, № 2-3. – С. 21–23.
11. Горлова, Е.Е. Патология иммунитета при туберкулезе / Е.Е. Горлова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2010. – № 35. – С. 37–44.
  12. Грудинкин, П.С. Регуляция апоптоза и пролиферации клеток эпидермоидной карциномы А431 при действии эпидермального фактора роста : автореф. дис. ... канд. биол. наук / П.С. Грудинкин. – СПб., 2007. – 24 с.
  13. Дефект антигенпрезентирующих 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.
  14. Динамика экспрессии CD25 в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных фитогемагглютинином или интерлейкином-2 / В.В. Зенин, Н.Д. Аксенов, А.Н. Шатрова, И.И. Марахова // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 6. – С. 506–510.
  15. Дисфункции 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.
  16. Домнинский, Д.А. Механизмы реализации сигнальной трансдукции / Д.А. Домнинский // Онкогематология. – 2011. – № 1. – С. 76–84.
  17. Донецкова, А.Д. Экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующую дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4+ Т-лимфоцитов, в покоящихся и активированных лимфоцитах у здоровых людей / А.Д. Донецкова, М.Ф. Никонова, А.А. Ярилин // Иммунология. – 2011. – № 4. – С. 184–188.
  18. Дьяченко, П.А. Роль Th17 – клеток в патогенезе аутоиммунных заболеваний / П.А. Дьяченко, А.Г. Дьяченко // Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина. – 2010. – № 2. – С. 14–22.
  19. Ешану, В.С. Цитокины и их биологические эффекты при некоторых болезнях печени / В.С. Ешану // Клинические аспекты гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – № 5. – С. 11–16.
  20. Железникова, Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию / Г.Ф. Железникова // Журнал инфектологии. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 6–13.

21. Жулай, Г.А. Регуляторные Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Перспективы применения в иммунотерапии / Г.А. Жулай, Е.К. Олейник // Труды Карельского научного центра РАН. – 2012. – № 2. – С. 3–17.
22. Значение кооперации транскрипционных факторов STAT6, STAT4, GATA-3 и T-bet при бронхиальной астме / В.И. Трофимов, В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина и др. // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т. 13, № 1. – С. 67–72.
23. Зурочка, А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7–16.
24. Ивашкин, В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – № 4. – С. 4–13.
25. Изучение цитокинов в крови больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией / Е.В. Макашева, О.Н. Конанчук, Е.В. Морозова, А.В. Панасенко // Журнал инфектологии. – 2009. – Т. 1, № 2-3. – С. 31–35.
26. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе / Е.В. Свирцевская, В.С. Митрофанов, Р.И. Шендерова и др. // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 3–13.
27. Иммунопатология туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. – Томск : Изд-во Томского университета, 2007. – 194 с.
28. 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, Т.Е. Кононова // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 143 – 146.
29. Иммуотропный эффект рифампицина как базового препарата противотуберкулезной химиотерапии / О.А. Васильева, О.И. Уразова, В.А. Серебрякова, Т.Е. Кононова // Актуальные проблемы инфекционной патологии : материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 85-летию кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии. – Томск, 2009. – С. 21–23.
30. Индукция экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 в кроветворных

- клетках-предшественниках и тимоцитах человека *in vitro* / А.А. Ярилин, Н.И. Шарова, М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова // Иммунология. – 2010. – № 5. – С. 232–235.
31. Инсанов, А.Б. Туберкулез : руководство для врачей и студентов / А.Б. Инсанов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 704 с.
32. Интегральная оценка напряжённости противотуберкулёзного иммунитета в экспериментальной модели БЦЖ-вакцинного процесса / Л.П. Ярилин, В.А. Черешнев, Л.А. Фокина, Г.М. Сафонова // Иммунология. – 2006. – № 2. – С. 84–88.
33. Интерлейкин-2 в коррекции анергии Т-клеток у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонов, А.А. Останин и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 1. – С. 48–51.
34. К вопросу о патологии иммунитета при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, О.И. Уразова и др. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2008. – № 1. – С. 15–18.
35. Казимирский, А.Н. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении / А.Н. Казимирский, Ж.М. Салмаси, Г.В. Порядин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – № 1. – С. 2–7.
36. Кайдашев, И.П. Цитокиновый сигнальный модуль при воспалительном ответе / И.П. Кайдашев // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2012. – № 3. – С. 26–32.
37. 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.
38. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 549 с.
39. Киселева, Е.П. Новые представления о противоинфекционном иммунитете / Е.П. Киселева // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, № 1. – С. 9–14.
40. Клинико-лабораторные сопоставления при исследовании новой сигнальной JAK-STAT-системы при бронхиальной астме / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина,

- Т.М. Лалаева, М.А. Нёма // Лабораторная диагностика. – 2011. – Т. 25, № 2. – С. 11–16.
41. Ковальчук, Л.В. Учение о воспалении в свете новых данных: развитие идей И.И. Мечникова / Л.В. Ковальчук // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 5. – С. 10–15.
  42. Корецкая, Н.М. Инфильтративный туберкулез легких / Н.М. Корецкая, А.А. Чушкина // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 4. – С. 46–49.
  43. Корецкая, Н.М. Особенности лечения больных диссеминированным туберкулезом легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией / Н.М. Корецкая, И.А. Большакова // Фтизиатрия и пульмонология. – 2011. – Т. 2, № 2. – С. 115–116.
  44. Костянян, И.А. STAT1– многоликий фактор транскрипции / И.А. Костянян, А.В. Вонаршенко, В.М. Липкин // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 1. – С. 15–28.
  45. Кошкина, А.А. Механизмы дизрегуляции рецепторопосредованной сигнальной трансдукции в Т-лимфоцитах крови при туберкулезе легких // А.А. Кошкина // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8-1. – С. 91–95.
  46. Макарова, О.В. Иммуноморфология гранулематозного воспаления при Th1- и Th2-типе иммунного ответа / О.В. Макарова, Л.П. Михайлова // Архив патологии. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 48–53.
  47. Маркелова, Е.В. Значение цитокинового статуса в ранней диагностике туберкулеза при ВИЧ-инфекции / Е.В. Маркелова, С.А. Сотниченко, Л.Ф. Скляр // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 38, № 4. – С. 44–47.
  48. Механизмы клеточной резистентности к цитомегаловирусу связаны с пролиферативным состоянием и транскрипционной активностью генов лейкоцитарного и иммунного интерферонов / Т.М. Соколова, Н.Е. Федорова, М.Г. Меджидова и др. // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 457–466.
  49. Минеев, В.Н. Влияние IL-4 на активность транскрипционного фактора STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина, М.А. Нёма // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 177–184.

50. Минеев, В.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии. Часть I / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина // Аллергология. – 2005. – № 4. – С. 38–44.
51. Минеев, В.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии: механизмы негативной регуляции. Часть II / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина // Аллергология. – 2006. – № 1. – С. 49–55.
52. Минеев, В.Н. Фундаментальные и клинические аспекты JAK-STAT-сигнализации / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина, В.И. Трофимов. – СПб. : ВВМ, 2010. – 119 с.
53. Митюшова, Е.В. Роль STAT5 в пролиферации культур клеток хронической лейкемии K562: анализ ингибирующего действия WHI-P131 / Е.В. Митюшова, Н.Д. Аксенов, И.И. Марахова // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 184–190.
54. Мишин, В.Ю. К проблеме оптимизации и доказательности современных режимов химиотерапии туберкулеза легких / В.Ю. Мишин, В.И. Чуканов, И.А. Васильева // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 8. – С. 7–15.
55. Мишин, В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких на основе принципов доказательной медицины / В.Ю. Мишин // Consilium medicum. – 2008. – Т. 10, № 3. – С. 20–25.
56. Мононуклеарные клетки периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.К. Стрелис, О.В. Воронкова и др. // Вестник РАМН. – 2006. – № 2. – С. 30–35.
57. Нейроэндокринная регуляция иммунитета / П.Н. Учанкин, О.Н. Учанкина, Б.В. Тобин, Ф.И. Ершов // Вестник РАМН. – 2007. – № 9. – С. 26–32.
58. Нестерова, И.В. Значимость коррекции интерферонового статуса в комплексной иммунотерапии хронического упорно-рецидивирующего орофациального герпеса / И.В. Нестерова, Л.В. Ломтатидзе, Л.Н. Кокова // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 57–62.
59. Новик, А.А. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза : учебное пособие / А.А. Новик, Т.А. Камилова, В.Н. Цыган ; под ред. Ю.Л. Шевченко. –



- М. : ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 222 с.
60. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 3. – С. 42–50.
  61. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов у больных туберкулезом легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 5. – С. 587–592.
  62. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Иммунология. – 2006. – № 2. – С. 76–79.
  63. Особенности экспрессии генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4+-Т-лимфоцитов, при аллергии / М.Ф. Никонова, А.Д. Донецкова, О.И. Сидорович и др. // Иммунология. – 2011. – № 4. – С. 189–191.
  64. Оценка влияния противотуберкулезных препаратов на цитохимический статус лимфоцитов *in vitro* / О.А. Васильева, О.И. Уразова, В.А. Серебрякова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 3. – С. 27–30.
  65. Перельман, М.И. Фтизиатрия / М.И. Перельман, В.А. Корякин, И.В. Богадельникова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2004. – 520 с.
  66. Пичугин, А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин, А.С. Апт // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 12. – С. 3–7.
  67. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 1. – С. 39–45.
  68. Правада, Н.С. оценка клинической эффективности и нежелательных побочных реакций лекарственного средства «циклоферон» в таблетках у пациентов с туберкулезом легких / Н.С. Правада, А.М. Будрицкий, В.А. Серегина // Вестник ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 99–106.
  69. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M.*

- tuberculosis* на течение иммунного ответа / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–87.
70. Продукция оксида азота мононуклеарами крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / А.К. Стрелис, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 57–61.
71. Пролиферативный и секреторный ответ мононуклеарных лейкоцитов на комбинированное воздействие этамбутола и микобактериального антигена / В.А. Серебрякова, О.А. Васильева, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 153–160.
72. Регуляторные Т-клетки при аллергии у детей / А.Д. Донецкова, Н.И. Шарова, М.М. Литвина и др. // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 2-3. – С. 159–166.
73. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых транзиттеров (оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева // Вестник науки Сибири. – 2011. – Т. 1, № 1-3. – С. 635–640.
74. Роль  $\gamma\delta$ T- и НК-клеток в иммунном ответе / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 138–142.
75. Роль различных киназных путей передачи сигнала в пролиферации трансформантов E1A+Ras / М.В. Абрамова, С.Б. Светликова, В.В. Гринкевич и др. // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 12. – С. 1071–1081.
76. 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.
77. Роль Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, О.В. Воронкова и др. // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 3. – С. 3–7.
78. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / Р.Р. Хасанова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др.

- др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – Т. 85, № 3. – С. 31–35.
79. Салина, Т.Ю. Особенности продукции интерферона- $\gamma$  при туберкулезе легких / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 96–100.
80. Салина, Т.Ю. Продукция интерферона- $\gamma$  мононуклеарными клетками крови больных при различных типах течения туберкулезного процесса / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 10. – С. 19–22.
81. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-1 : физиология, патология, клиника / А.С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2011. – 473 с.
82. Симбирцев, А.С. Роль цитокинов в регуляции физиологических функций иммунной системы / А.С. Симбирцев // Физиология и патология иммунной системы. – 2004. – № 10. – С. 3 – 10.
83. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–22.
84. Скрягина, Е.М. Характеристика Т- и В-лимфоцитов у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / Е.М. Скрягина // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 4. – С. 49–55.
85. Современные представления о механизмах формирования иммунного ответа слизистой оболочки кишечника у детей раннего возраста / М.И. Дубровская, Ю.Г. Мухина, Л.И. Кафарская, П.В. Шумилов // Трудный пациент. – 2006. – Т. 4, № 6. – С. 9–14.
86. Сорокина, Л.Н. Патогенетические и клинические аспекты нарушений регуляции сигнализации транскрипционного фактора STAT6 при бронхиальной астме : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Л.Н. Сорокина. – СПб., 2010. – 32 с.
87. Соснина, А.В. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований : информационно-методическое пособие / А.В. Соснина, Н.В. Великая, А.И. Аутеншлюс. – Новосибирск : Вектор-Бест, 2013. – 80 с.
88. 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.
89. Титов, Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // Белорусский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 28–35.
90. Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии / Д.В. Щебляков, Д.Ю. Логунов, А.И. Тухватулин и др. // Acta naturae. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 14–23.
91. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, Е.В. Курганов и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 5. – С. 23–28.
92. Туберкулез. Особенности течения, возможности фармакотерапии : учебное пособие для врачей / под ред. А.К. Иванова. – СПб. : Тактик-Студио, 2009. – 108 с.
93. Тюлькова, Т.Е. Особенности функционирования иммунной системы при туберкулезной инфекции / Т.Е. Тюлькова, Ю.П. Чугаев, Э.А. Кашуба // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 11. – С. 48–55.
94. Уразова, О.И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких / О.И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 5–13.
95. Феномен внеклеточной бактерицидности нейтрофилов и механизмы защиты бактерий от действия лейкоцитарной эластазы / А.Л. Кравцов, Т.П. Шмелькова, Е.Ю. Лоцманова и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2007. – № 1. – С. 49–52.
96. Флейс, Дж. Статистические методы для изучения долей и пропорций / Дж. Флейс ; пер. с англ. И.Л. Легостаевой, А.М. Никифорова ; под ред. Ю.Н. Благовещенского. – М. : Финансы и статистика, 1989. – 317 с.
97. Фрейдлин, И.С. Современные представления о фагоцитарной теории / И.С. Фрейдлин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 5. – С. 4–10.
98. Хаитов, Р.М. Иммунология : учебник для студентов / Р.М. Хаитов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 528 с.

99. Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких / Е.Ф. Чернушенко, Л.П. Кадан, О.Р. Панасюкова и др. // Украинский пульмунологический журнал. – 2010. – № 2. – С. 39–43.
100. Чучалин, А.Г. Новые данные иммунных реакций при туберкулезе / А.Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2004. – Т. 12, № 2. – С. 88–93.
101. Ярилин, А.А. Иммунология : учебник / А.А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
102. Ярилин, А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов / А.А. Ярилин // Иммунология. – 2010. – № 3. – С. 153–168.
103. A novel IL-6/IL-12 family cytokine IL-27 and its antitumor activity / T. Yoshimoto, T. Owaki, M. Asakawa et al. // Gene Ther. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 9. – P. 7–14.
104. A Pivotal Role for Interleukin-27 in CD8<sup>+</sup> T Cell Functions and Generation of Cytotoxic T Lymphocytes [Electronic resource] / N. Morishima, I. Mizoguchi, M. Okumura et al. // J. Biomed. Biotechnol. – 2010. – Vol. 2010. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2862320/>.
105. Abromson-Leeman, S. Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR $\gamma$ t consistently produce IFN $\gamma$  but have a spectrum of IL-17 profiles / S. Abromson-Leeman, R.T. Bronson, M.E. Dorf // J. Neuroimmunol. – 2009. – Vol. 215, N 1-2. – P. 10–24.
106. Acetylation modulates the STAT signaling code / M. Wieczorek, T. Ginter, P. Brand et al. // Cytokine Growth Factor Rev. – 2012. – Vol. 23. – P. 293–305.
107. Acquired STAT4 deficiency as a consequence of cancer chemotherapy / I.P. Lupov, L. Voiles, L. Han et al. // Blood. – 2011. – Vol. 118, N 23. – P. 6097–6106.
108. Activation of cGMP-dependent protein kinase I $\beta$  inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells / T.A. Fischer, A. Palmetshofer, S. Gambaryan et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 8. – P. 5967–5974.
109. Ahlers, J.D. Molecular pathways regulating CD4<sup>+</sup> T cell differentiation, anergy and memory with implications for vaccines / J.D. Ahlers, I.M. Belyakov // Trends Mol. Med. – 2010. – Vol. 16, N 10. – P. 478–491.
110. Ahmad, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection [Electronic resource] / S. Ahmad // Clin. Dev. Immunol. –

2011. – Vol. 2011. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2011/814943/>.
111. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections / I.S. Jin, T.-J. Kang, S.-B. Lee et al. // *Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 127. – P. 214–224.
112. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells / S. Kamiya, T. Owaki, N. Morishima et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173, N 6. – P. 3871–3877.
113. Analysis of Toll-like receptors, iNOS and cytokine profiles in patients with pulmonary tuberculosis during anti-tuberculosis treatment [Electronic resource] / L.R. de Oliveira, E. Peresi, A. Mde Golim et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, N 2. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928236/>.
114. Barnes, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8, N 3. – P. 183–192.
115. Barnes, P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, N 11. – P. 3546–3556.
116. Barry, S.P. Investigating the role of the JAK/STAT and MAPK Pathways in Ischaemia / S.P. Barry // *Reperfusion Injury and Inflammation.* – Guilford, 2009. – 321 p.
117. Batten, M. The biology and therapeutic potential of interleukin 27 / M. Batten, N. Ghilardi // *J. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 85, N 7. – P. 661–672.
118. Benczik, M. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes / M. Benczik, S.L. Gaffen // *Immunol. Invest.* – 2004. – Vol. 33, N 2. – P. 109–142.
119. Bhatt, K. Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis / K. Bhatt, P. Salgame // *J. Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 347–362.
120. Buitenhuis, M. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) / M. Buitenhuis, P.J. Coffey, L. Koenderman // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36, N 11. – P. 2120–2124.
121. Cai, B. The role of IL-27 and IL-35 in inflammatory diseases. – Glasgow, 2008. – 264 p.
122. Casanova, J. Inborn Errors of Human JAKs and STATs / J. Casanova, S.M. Holland, L.D. Notarangelo // *Immunity.* – 2012. – Vol. 36, N 4. – P. 515–528.

123. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease / X. Chen, B. Zhou, M. Li et al. // Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 123, N 1. – P. 50–59.
124. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis [Electronic resource] / J. Zuñiga, D. Torres-Garcia, T. Santos-Mendoza et al. // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – Vol. 2012. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/193923/>.
125. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis / Q. Tan, W.P. Xie, R. Min et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 31, N 6. – P. 1233–1242.
126. Claman, H.V. Natural suppressor cell / H.V. Claman, H.H. James, T. Maier // 6<sup>th</sup> Int. Cong. Immunol. – 2006. – P. 1035–1039.
127. Cocco, C. Anti-leukemic properties of IL-12, IL-23 and IL-27: Differences and similarities in the control of pediatric B acute lymphoblastic leukemia / C. Cocco, V. Pistoia, I. Airoidi // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2012. – Vol. 83, N 3. – P. 310–318.
128. Colocalization of the IL-12 receptor and FcγRIIIa to natural killer cell lipid rafts leads to activation of ERK and enhanced production of interferon-γ / S.V. Kondadasula, J.M. Roda, R. Parihar et al. // Blood. – 2008. – Vol. 111, N 8. – P. 4173–4183.
129. Combination of nifedipine and subtherapeutic dose of cyclosporin additively suppresses mononuclear cells activation of patients with rheumatoid arthritis and normal individuals via Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway / N.S. Lai, C.L. Yu, W.Y. Yin et al. // Clin. Exp. Immunol. – 2012. – Vol. 168, N 1. – P. 78–86.
130. Commins, S.P. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines / S.P. Commins, L. Borish, J.W. Steinke // J. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125, N 2. – P. 53–71.
131. Comparative Study of Human Hematopoietic Cell Engraftment into Balb/c and C57BL/6 Strain of Rag-2/Jak3 Double-Deficient Mice [Electronic resource] / A. Ono, S. Hattori, R. Kariya et al. // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – Vol. 2011. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/539748/>.

132. Compartmentalized bronchoalveolar IFN- $\gamma$  and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis / M.T. Herrera, M. Torres, D. Nevels et al. // *Tuberculosis*. – 2009. – Vol. 89, N 1. – P. 38–47.
133. Computational modeling of tuberculous meningitis reveals an important role for tumor necrosis factor- $\alpha$  / M. El-Kebir, M. van der Kuip, A.M. van Furth, D.E. Kirschner // *Journal of Theoretical Biology*. – 2013. – Vol. 328. – P. 43–53.
134. Contribution of Thy1<sup>+</sup> NK cells to protective IFN- $\gamma$  production during *Salmonella* Typhimurium infections / A. Kupz, T.A. Scott, G.T. Belz et al. // *Immunology*. – 2013. – Vol. 110, N 6. – P. 2252–2257.
135. Cytokines Involved in Interferon- $\gamma$  Production by Human Macrophages / C.M. Robinson, D. O’Dee, T. Hamilton, G.J. Nau // *J. Innate Immun.* – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 56–65.
136. Darnell, J.E. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins / J.E. Darnell, I.M. Kerr, G.R. Stark // *Science*. – 1994. – Vol. 264. – P. 1415–1421.
137. Decrease of Foxp3<sup>+</sup> Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infection / G. Oldenhove, N. Bouladoux, E.A. Wohlfert // *Immunity*. – 2009. – Vol. 31, N 5. – P. 772–786.
138. Decreased phosphorylation of STAT-1, STAT-4 and cytokine release in MDR-TB patients with primary resistance / H.J. Kim, D.H. Chung, M.J. Kim et al. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2008. – Vol. 12, N 9. – P. 1071–1076.
139. Dipyrithione inhibits IFN- $\gamma$ -induced JAK/STAT1 signaling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in RAW264.7 cells / C. Han, J. Fu, Z. Liu et al. // *Inflamm. Res.* – 2010. – Vol. 59, N 10. – P. 809–816.
140. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs / L. Pompei, S. Jang, B. Zamlynny et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, N 8. – P. 5192–5199.
141. Effects of dendritic cells transfected with full length wild type P53 and modified by gastric cancer lysate on immune response / H. Sun, Q. Tang, Y. Chen et al. // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 24, N 5. – P. 460–463.
142. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses / S. Sato, H. Sanjo, K. Takeda et al. // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 11. – P. 1087–



- 1095.
143. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 and other interleukin-12-related molecules by human intestinal epithelium / Ch. Maaser, L.J. Egan, M.P. Birkenbach et al. // *Immunology*. – 2004. – Vol. 112, N 3. – P. 437–445.
  144. Fearon, U. Interleukin-27: A Master Regulator in Inflammation / U. Fearon // *Arthritis. Rheum.* – 2011. – Vol. 63, N 8. – P. 2157–2160.
  145. Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells among Tuberculosis Patients: Impact on Prognosis and Restoration of Antigen Specific IFN- $\gamma$  Producing T Cells / A. Singh, A.B. Dey, A. Mohan et al. // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, N 9. – P. 1–10.
  146. Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Suppress Effector T-Cell Function at Pathologic Site in Miliary Tuberculosis / P.K. Sharma, P.K. Saha, A. Singh et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 179, N 11. – P. 1061–1070.
  147. Furumoto, Y. The Arrival of JAK Inhibitors: Advancing the Treatment of Immune and Hematologic Disorders / Y. Furumoto, M. Gadina // *BioDrugs*. – 2013. – Vol. 27, N 5. – P. 431–438.
  148. GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing Il-4 and IL-5 levels / I. Ferber, H. Lee, F. Zonin et al. // *Clin. Immunol.* – 1999. – Vol. 91, N 2. – P. 134–144.
  149. Greenwald, L.J. JAK: no longer ‘just another kinase’ / L.J. Greenwald, M. White-Greenwald // *Int. J. Clin. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 6, N 4. – P. 401–410.
  150. Guirado, E. Macrophages in tuberculosis: friend or foe / E. Guirado, L.S. Schlesinger, G. Kaplan // *Semin. Immunopathol.* – 2013. – Vol. 35, N 5. – P. 563–583.
  151. High levels of IDO-expressing CD16<sup>+</sup> peripheral cells, and Tregs in graft biopsies from kidney transplant recipients under belatacept treatment / J. Furuzawa-Carballeda, G. Lima, N. Uribe-Uribe et al. // *Transplant. Proc.* – 2010. – Vol. 42, N 9. – P. 3489–3496.
  152. Hölscher, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases / C. Hölscher // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol. 193, N 1. – P. 1–17.
  153. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses / Y. Shi, J. Su, A.I. Roberts et al. // *Trends Immunol.* – 2012. – Vol. 33, N 3. – P. 136–143.

154. Hunter, C.A. Interleukin-27: Balancing Protective and Pathological Immunity / C.A. Hunter, R. Kastelein // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37, N 6. – P. 960–969.
155. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions / C.A. Hunter // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, N 7. – P. 521–531.
156. Identification of a human Th1-like IFN $\gamma$ -secreting Treg subtype deriving from effector T cells / R.K. Venigalla, P.J. Guttikonda, V. Eckstein et al. // *J. Autoimmun.* – 2012. – Vol. 39. – P. 377–387.
157. IFN- $\gamma$  signaling–Does it mean JAK–STAT? / D.J. Gough, D.E. Levy, R.W. Johnstone, C.J. Clarke // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2008. – Vol. 19, N 5-6. – P. 383–394.
158. IL-10 Dependent Suppression of Type 1, Type 2 and Type 17 Cytokines in Active Pulmonary Tuberculosis / N.P. Kumar, V. Gopinath, R. Sridhar et al. // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8, N 3. – P. 1–9.
159. IL-27 Receptor Signalling Restricts the Formation of Pathogenic, Terminally Differentiated Th1 Cells during Malaria Infection by Repressing IL-12 Dependent Signals / A. Villegas-Mendez, J. B. de Souza, S. Lavelle et al. // *PLOS Pathogens*. – 2013. – Vol. 4, N 9. – P. 1–14.
160. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms / L. Sophie, N. Ghilardi, J.F.J. Li et al. // *Sauvage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100, N 25. – P. 15047–15052.
161. IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD / A.V. Villarino, D. Artis, J.S. Bezbradica et al. // *Int. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, N 6. – P. 739–752.
162. Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in the Parietal Pleura of Patients with Tuberculous Pleurisy / G. Caramori, L. Lasagna, A.G. Casalini et al. // *PLOS ONE*. – 2011. – Vol. 6, N 7. – P. 1–17.
163. Immunotherapy with Leukocyte Immunomodulator Dialysate in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis / S.O. Cherenko, O.A. Reva, O.M. Rekalova et al. // *Asthma and allergy*. – 2013. – Vol. 3. – P. 13–20.
164. Increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells from TB patients / L. Li, S. Lao, C. Wu // *Tuberculosis*. – 2007. – Vol. 87, N 6. – P. 526–534.

165. Inflammatory signals in dendritic cell activation and induction of adaptive immunity / O. Joffre, M. Nolte, R. Sporri, C. Reis e Sousa // *Immun. Rev.* – 2009. – Vol. 227, N 1. – P. 234–247.
166. Interferon: Cellular Executioner or White Knight? / S.G. Maher, A.L. Romero-Weaver, A.J. Scarzello, A.M. Gamero // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14, N 12. – P. 1279–1289.
167. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-alpha induction / S. Uematsu, S. Sato, M. Yamamoto et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 201, N 6. – P. 915–923.
168. Interleukin-12 to interleukin ‘infinity’: the rationale for future therapeutic cytokine targeting / E.J.R. Anderson, M.A. McGrath, T. Thalhamer, I.B. McInnes // *Springer Semin. Immunopathol.* – 2006. – Vol. 27, N 4. – P. 425–442.
169. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity / M. Matsui, T. Kishida, H. Nakano et al. // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 6. – P. 2523–2530.
170. Isoform selective inhibition of STAT1 or STAT3 homo-dimerization via peptidomimetic probes: structural recognition of STAT SH2 domains / P.T. Gunning, W.P. Katt, M. Glenn et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17, N 7. – P. 1875–1878.
171. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies / S.S. Jatiani, S.J. Baker, L.R. Silverman, E.P. Reddy // *Genes. Cancer.* – 2010. – Vol. 1, N 10. – P. 979–993.
172. Jankowski, M. Interleukin-27: Biological Properties and Clinical Application / M. Jankowski, P. Kopiński, A. Goc // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2010. – Vol. 58, N 6. – P. 417–425.
173. Jassal, M. Extensively drug-resistant tuberculosis / M. Jassal, W.R. Bishai // *Lancet Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 9, N 1. – P. 19–30.
174. JunD/AP-1 and STAT3 are the major enhancer molecules for high Bcl6 expression in germinal center B cells / E. Arguni, M. Arima, N. Tsuruoka et al. // *Int. Immunol.* – 2006. – Vol. 18, N 7. – P. 1079–1089.
175. Jung, J. IL-12 and IL-27 regulate the phagolysosomal pathway in mycobacteria-

- infected human macrophages [Electronic resource] / J. Jung, C.M. Robinson // *Cell Commun. Signal.* – 2014. – Vol. 12, N 16. – URL: <http://www.biosignaling.com/content/12/1/16>.
176. Kang, H.C. Disease-specific pluripotent stem cells / H.C. Kang, J. Korean // *Pediatr.* – 2010. – Vol. 53, N 8. – P. 786–789.
177. Kaushal, M. The JAK/STAT Signaling Pathway / M. Kaushal, N.M. Chorawala // *Kaushal Chorawala IJARPB.* – 2012. – Vol. 2, N 3. – P. 363–385.
178. Krywejko, J. Jak3 – Its Significance in Inflammatory Diseases of Joints – New Perspectives for Therapy / J. Krywejko, E. Morgiel, P. Wiland // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 17, N 4. – P. 479–484.
179. Lazarevich, V. T-bet in disease / V. Lazarevich, L.H. Glimcher // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol. 12, N 7. – P. 597–606.
180. Leeman, J.R. Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway / J.R. Leeman, T.D. Gilmore // *Gene.* – 2008. – Vol. 423, N 2. – P. 97–107.
181. Lyadova, I. Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression / I. Lyadova // *Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity.* – 2012. – 43 p.
182. Lymphocyte Subgroups in Different Forms of Tuberculosis / K. Aksu, E. Kurt, Ş. Parspour et al. // *Tur. Toraks Der.* – 2012. – Vol. 13. – P. 1–5.
183. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function / F. Macian // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, N 6. – P. 472–484.
184. Malemud, C.J. Suppression of Autoimmune Arthritis by Small Molecule Inhibitors of the JAK/STAT Pathway / C.J. Malemud // *Pharmaceuticals.* – 2010. – Vol. 3, N 5. – P. 1446–1455.
185. Malemud, C.J. Targeting JAKSTAT signaling pathway in inflammatory diseases / C.J. Malemud, E. Pearlman // *Curr. Signal Transduct. Ther.* – 2009. – Vol. 4, N 3. – P. 201–221.
186. Mathematical Models of Anti-TNF Therapies and their Correlation with Tuberculosis / S. Marino, M. Fallahi-Sichani, J.J. Linderman, D.E. Kirschner // *John Wiley & Sons, Inc.* – 2012. – Vol. 15. – P. 83–104.
187. McAleer, P.J. The WSX-1 pathway restrains intestinal T-cell immunity / P.J. McAleer, C.J. Saris, A.T. Vella // *Int. Immunol.* – 2011. – Vol. 23, N 2. – P.

- 129–137.
188. McGuirk, P. The Role of Regulatory T Cells in Respiratory Infections and Allergy and Asthma // P. McGuirk, S.C. Higgins, K. Mills // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2010. – Vol. 10, N 1. – P. 21–28.
189. Mechanisms of NK cell activation: CD4<sup>+</sup> T cells enter the scene / F. Bihl, C. Germain, C. Luci, V.M. Braud // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68. – P. 3457–3467.
190. Méndez-Samperio, P. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease / P. Méndez-Samperio // *Int. J. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 14, N 5. – P. 366–371.
191. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered response to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide / R. Kamijo, J. Le, D. Shapiro et al. // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178, N 4. – P. 1435–1440.
192. Mirpuri, J. IL-6 signaling SOCS critical for IL-12 host response to *Toxoplasma gondii* / J. Mirpuri, F. Yarovinsky // *Future Microbiol.* – 2012. – Vol. 7, N 1. – P. 13–16.
193. Molecular Pathways in the Induction of Interleukin-27-Driven Regulatory Type 1 Cells / C. Pot, L. Apetoh, A. Awasthi, V.K. Kuchroo // *J. Interferon. Cytokine. Res.* – 2010. – Vol. 30, N 6. – P. 381–388.
194. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes / D. Dalton, S. Pitts-Meek, S. Keshav et al. // *Science.* – 1993. – Vol. 259, N 5102. – P. 1739–1742.
195. Murray, P.J. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration / P.J. Murray // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, N 5. – P. 2623–2629.
196. *Mycobacterium bovis* BCG infection severely delays *Trichuris muris* expulsion and co-infection suppresses immune responsiveness to both pathogens / H.J. Nel, N. Plessis, L. Kleynhans et al. // *BMC Microbiology.* – 2014. – Vol. 14, N 9. – P. 1–13.
197. Natural Killer Cell Responses to Infections in Early Life / A. Guilmot, E. Hermann, V.M. Braud et al. // *J. Innate Immun.* – 2011. – Vol. 3, N 3. – P. 280–288.
198. Natural killer T cells in pulmonary disorders / M. Rijavec, S. Volarevic, K. Osolnik

- et al. // *Respir. Med.* – 2011. – Vol. 105, N 51. – P. 520–525.
199. NK Cell-Derived Interferon- $\gamma$  Orchestrates Cellular Dynamics and the Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells at the Site of Infection / R.S. Goldszmid, P. Caspar, A. Rivollier et al. // *Immunity.* – 2012. – Vol. 36, N 6. – P. 1047–1059.
200. Novel Function of IFN- $\gamma$ : Negative Regulation of Dendritic Cell Migration and T Cell Priming / X. Wu, W. Hou, S. Sun et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 934–943.
201. O’Shea, J.J. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer / J.J. O’Shea, S.M. Holland, L.M. Staudt // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 368, N 2. – P. 161–170.
202. Palmer, D.C. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function / D.C. Palmer, N.P. Restifo // *Trends Immunol.* – 2009. – Vol. 30, N 12. – P. 592–602.
203. Peng, S.L. The T-box Transcription Factor T-bet in Immunity and Autoimmunity / S.L. Peng // *Cellular & Molecular Immunology.* – 2006. – Vol. 3, N 2. – P. 87–95.
204. Popov, A. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection / A. Popov, J.L. Schultze // *J. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 86, N 2. – P. 145–160.
205. Pot, C. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells / C. Pot, H. Jin, A. Awasthi et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 2. – P. 797–801.
206. Raja, A. Immunology of tuberculosis / A. Raja // *Indian J. Med. Res.* – 2004. – Vol. 120, N 4. – P. 213–232.
207. Reeme, A.E. IL12B expression is sustained by a heterogenous population of myeloid lineages during tuberculosis / A.E. Reeme, H.E. Miller, R.T. Robinson // *Tuberculosis.* – 2013. – Vol. 93. – P. 343–356.
208. Regulatory T cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis / V. Guyot-Revol, J.A. Innes, S. Hackforth et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173, N 7. – P. 803–810.
209. Reljic, R. IFN- $\gamma$  Therapy of Tuberculosis and Related Infections / R. Reljic // *J. Interferon. Cytokine Res.* – 2007. – Vol. 27. – P. 353–364.
210. Role of Endogenous IFN- $\gamma$  in Macrophage Programming Induced by IL-12 and IL-18

- / K. Bastos, R. Barboza, L. Sardinha et al. // *J. Interferon. Cytokine Res.* – 2007. – Vol. 27. – P. 399–410.
211. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis / Y. Cavalcanti, M. Brelaz, J. Neves et al. // *Pulmonary Medicine.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–10.
212. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: history and perspective / S. Sakaguchi // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 707. – P. 3–17.
213. Sasindran, S.J. Mycobacterium tuberculosis infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium? [Electronic resource] / S.J. Sasindran, J.B. Torrelles // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol. 2, N 2. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109289/>.
214. Schindler, C. Inteférons pen the JAK–STAT pathway / C. Schindler, C. Plumlee // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2008. – Vol. 19, N 4. – P. 311–318.
215. Schwander, S. Human Lung Immunity against Mycobacterium tuberculosis Insights into Pathogenesis and Protection / S. Schwander, K. Dheda // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 183, N 6. – P. 696–707.
216. Shuai, K. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system / K. Shuai, B. Liu // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3, N 11. – P. 900–911.
217. Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination / V.T. Thieu, Q. Yu, H. Chang et al. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29. – P. 679–690.
218. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4 / W.T. Watford, B.D. Hissong, J.H. Bream et al. // *Immunol. Rev.* – 2004. – Vol. 202, N 1. – P. 139–156.
219. STAT proteins – Key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver / B. Gao, H. Wang, F. Lafdil, D. Feng // *J. Hepatol.* – 2012. – Vol. 57, N 2. – P. 430–441.
220. Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells / L.R. Grant, Z.-J. Yao, C.M. Hedrich // *Genes. Immun.* – 2008. – Vol. 9. – P. 316–327.
221. Sundareshan, V. Mycobacteria and Biological Response Modifiers: Two Sides of the Relationship / V. Sundareshan, J. Modi, N.M. Khardori // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2011. – Vol. 25. – P. 865–893.

222. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells / D.C. Fitzgerald, G. Zhang, M. El-Behi et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 12. – P. 1372–1379.
223. T cell polarity at the immunological synapse is required for CD154-dependent IL-12 secretion by dendritic cells / M. Tourret, S. Guegan, K. Chemin et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, N 11. – P. 6809–6818.
224. T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component / C. Brockmeyer, W. Paster, D. Pepper et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 9. – P. 7535–7547.
225. T regulatory cells and Th1/Th 2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients / X.-Y. He, L. Xiao, H.-B. Chen et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 29, N 6. – P. 643–650.
226. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo / J.H. Shim, C. Xiao, A.E. Paschal et al. // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19, N 22. – P. 2668–2681.
227. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells / M. Afkarian, J.R. Sedy, J. Yang et al. // *Nat. Immunol.* – 2002. – Vol. 3, N 6. – P. 549–557.
228. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses / W.T. Watford, M. Moriguchi, A. Morinobu, J.J. O’Shea // *Cytokine Growth. Factor Rev.* – 2003. – Vol. 14, N 5. – P. 361–368.
229. The Current Concept of TH17 Cells and Their Expanding Role in Systemic Lupus Erythematosus [Electronic resource] / D. Perry, A.B. Peck, W.C. Carcamo et al. // *Arthritis.* – 2011. – Vol. 2011. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226200/>.
230. The TBX21 transcription factor T-1993C polymorphism is associated with decreased IFN- $\gamma$  and IL-4 production by primary human lymphocytes / K.M. Fyall, A.M. Fong, S.B. Rao et al. // *Hum. Immunol.* – 2012. – Vol. 73. – P. 673–676.
231. Thermal injury-induced peroxynitrite production and pulmonary inducible nitric oxide synthase expression depend on JNK/AP-1 signaling / L.W. Chen, W.J. Chang, J.S. Wang, C.M. Hsu // *Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 34, N 1. – P. 142–150.
232. Thomas, D.D. *The Chemical Biology of Nitric Oxide. Implications in Cellular*



- Signaling / D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45, N 1. – P. 18–31.
233. TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages / A. Yarilina, K. Xu, J. Chen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, N 4. – P. 1573–1578.
234. TNF- $\alpha$  is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection / A. Zganiacz, M. Santosuosso, J. Wang et al. // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 113, N 3. – P. 401–413.
235. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria / V. Quesniaux, C. Fremond, M. Jacobs et al. // *Microbes Infect.* – 2004. – Vol. 6, N 10. – P. 946–959.
236. Vignali, D.A. IL-12 family cytokines: immunological playmakers / D.A. Vignali, V.K. Kuchroo // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13, N 8. – P. 722–728.
237. Wheelock, E. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin / E. Wheelock // *Science.* – 1965. – Vol. 149, N 3681. – P. 310–311.
238. Wood, K. Interferon-gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T-cells in vivo / K. Wood, B. Sawitzki // *Trends Immunol.* – 2006. – Vol. 27, N 4. – P. 183–187.
239. Wu, W. Janus kinase 3: the controller and the controlled / W. Wu, X.-H. Sun // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* – 2012. – Vol. 44, N 3. – P. 187–196.