

*На правах рукописи*

**Кошкина Анна Алексеевна**

**МЕХАНИЗМЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ  
РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННОЙ АКТИВАЦИИ  
Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

**14.03.03 – патологическая физиология  
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Томск – 2012**

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

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАМН,  
заслуженный деятель науки РФ

**Новицкий Вячеслав Викторович**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Уразова Ольга Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор, главный научный сотрудник  
лаборатории патофизиологии  
ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН

**Агафонов Владимир Иванович**

доктор медицинских наук,  
профессор кафедры гистологии,  
эмбриологии и цитологии  
ГБОУ ВПО СибГМУ  
Минздравсоцразвития России

**Потапов Алексей Валерьевич**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Петрова И.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Положение о том, что в основе туберкулеза легких (ТЛ) лежит дисрегуляция иммунной системы, стало основой для более детального изучения иммунопатогенеза туберкулезной инфекции и поиска маркерных нарушений со стороны иммунокомпетентных клеток крови [Новицкий В.В. и соавт., 2006; Ивашкин В.Е., 2008]. При этом важную роль отводят межклеточной кооперации, в процессе которой происходит активация наивных Т-клеток с последующей их дифференцировкой в Т-лимфоциты хелперы (Th) типа 1, участвующие в реакциях Т-клеточного иммунного ответа [Свирищевская Е.В. и соавт., 2005; Ивашкин В.Е., 2008; Ярилин А.А., 2010; Schwander S., Dheda K., 2011].

Одной из главных предпосылок к активному изучению роли Т-клеток в формировании защиты против *Mycobacterium tuberculosis* является их способность синтезировать цитокины, в частности интерлейкин (IL) 2. Способность IL-2 направлять дифференцировку наивных Т-клеток в Th1-лимфоциты, регулировать реакции гиперчувствительности замедленного типа, предотвращать гиперактивацию иммунной системы при смещении баланса Т-хелперных клонов по пути доминирования гуморальных реакций иммунитета играет значительную роль в патогенезе туберкулезной инфекции [Симбирцев А.С., 2004; Зенин В.В. и соавт., 2009; Сологуб Т.В. и соавт., 2009; Ярилин А.А., 2010; Almeida A. et al., 2011; Zuñiga J. et al., 2012].

Дефицит IL-2, часто регистрируемый у больных ТЛ, большинство авторов связывают с развитием вторичной иммунологической недостаточности (ВИН), а среди причин, обуславливающих ее развитие, выделяют уменьшение количества и/или функциональную несостоятельность (гипо- и анергию) Т-клеток [Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2003; Чучалин А.Г., 2004; Новицкий В.В. и соавт., 2005; 2006; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Алешина Р.М., 2007; Лусс Л.В., 2007; Маркелова Е.В., 2008; Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П., 2008; Хасанова Р.Р. и соавт., 2008; Корецкая Н.М., 2011; Корецкая Н.М., Большакова И.А., 2011]. Однако вопрос о том, какие механизмы лежат в основе Т-лимфоцитопении и/или анергии Т-клеток при ТЛ остается спорным и требует детального анализа.

Нарушения межклеточной кооперации, опосредующей активацию Т-лимфоцитов в процессе взаимодействия их CD3-рецепторов (CD3-TCR) с комплексом «МНС II-пептид» антигенпрезентирующих клеток (АРС) при участии корецептора CD4 и костимулирующих рецепторных молекул (CD28 на Т-лимфоцитах, CD80/CD86 на АРС), могут быть одной из причин Т-клеточного дефицита [Felix N., 2010; Harding S., Boon W., 2010]. Важная роль при этом отводится процессам костимуляции. Так, взаимодействие CD28-молекулы на Т-лимфоцитах и CD80/CD86 на АРС является ключевым импульсом, «разрешающим» активацию Т-клеток и развитие Th1-иммунного ответа. Отсутствие или недостаточность данного сигнала приводят к гибели Т-клеток путем активации программы апоптоза [Wang H. et al., 2005; Briken V., Miller J., 2008].

Помимо этого, некоторые ингибиторные молекулы иммуносупрессорных Т-регуляторных клеток (прежде всего, цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 или CTLA-4) в силу своей высокой авидности к молекулам CD80/CD86 на APC способны блокировать CD28-костимуляторный сигнал в Т-лимфоцитах и, таким образом, подавлять их активацию [Mukherjee S. et al., 2006; Goronzy J., Weyand C., 2008; Ahmed A., 2009].

Известно, что индукция Т-лимфоцитов, опосредованная комплексом «МНС II-пептид-TCR-костимулирующие молекулы», приводит к запуску основных каскадных путей активации ядерных факторов NF-κB, AP-1, NFAT, иницирующих транскрипцию гена *IL2* и секрецию данного цитокина, активирующего процессы пролиферации и дифференцировки Т-клеток [Скулачев М.В., 2005; Macian F., 2005; Gelinis C., 2006; Абатуров А.Е., 2007; Киселевский М.В., 2008; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Щепляков Д.В. и соавт., 2010; Jung D.H. et al., 2010; Домнинский Д.А., 2011; Yarilina A. et al., 2011; Lee D., 2012].

Между тем, несмотря на значительные успехи в изучении роли основных рецепторных молекул и транскрипционных факторов в регуляции Th1-иммунного ответа, механизмы гипопродукции IL-2, связанные с нарушениями TCR-опосредованной активации Т-лимфоцитов при туберкулезной инфекции, изучены недостаточно, а представленные в научной литературе данные носят фрагментарный и порой противоречивый характер. Учитывая, что рецептор-опосредованная активация Т-лимфоцитов является сложным комплексным процессом, при котором нарушения могут присутствовать в различных его звеньях, исследование в данной области является своевременным и актуальным.

**Цель исследования:** выявить механизмы и установить особенности нарушений рецептор-опосредованной активации Т-лимфоцитов при различных клинко-патогенетических вариантах туберкулеза легких.

**Задачи исследования:**

1. Провести сравнительную оценку базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* у здоровых доноров и больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.
2. Оценить количество IL-2-синтезирующих лимфоцитов крови, экспрессирующих антигены CD3 (TCR) и CD28, у здоровых доноров и больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.
3. Оценить содержание CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток и активных форм внутриклеточных транскрипционных факторов (NF-κB, NFAT и AP-1) в Т-лимфоцитах крови при CD3/CD28-индукции *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких.
4. Установить молекулярные механизмы дизрегуляции рецептор-опосредованной

активации Т-лимфоцитов при туберкулезе легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.

**Научная новизна исследования.** Впервые проведено комплексное исследование молекулярных механизмов дизрегуляции передачи сигнала рецептор-опосредованной активации Т-лимфоцитов и дана их сравнительная оценка при различных клинко-патогенетических вариантах туберкулеза легких (ТЛ). Показано, что гипопродукция IL-2 *in vitro* (базальная и при индукции антиCD3- и антиCD28-антителами) при ТЛ сочетается с уменьшением общего числа CD3- и CD28-позитивных лимфоцитов в крови и изменением их субпопуляционного состава вследствие снижения количества CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> и увеличения содержания CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>IL2<sup>-</sup> клеток на фоне выраженной Т-лимфоцитопении. Продемонстрировано, что у больных ТЛ имеет место увеличение процентного и абсолютного числа лимфоцитов с иммуносупрессорным фенотипом CD3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, что, наряду с дефицитом активных форм факторов транскрипции NF-κB и NFAT2 в Т-клетках, обуславливает нарушение трансдукции сигнала CD3/CD28-опосредованной активации в Т-лимфоцитах синтеза и секреции IL-2. Установлено, что инфильтративный лекарственно-устойчивый (ЛУ) ТЛ характеризуется увеличением числа Т-лимфоцитов, содержащих активные формы транскрипционных факторов NFAT1 и AP-1, тогда как при лекарственно-чувствительном (ЛЧ) его варианте количество CD3<sup>+</sup>NFAT1<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>AP-1<sup>+</sup> остается в пределах нормы. Диссеминированный ТЛ сопровождается снижением количества данного типа клеток – CD3<sup>+</sup>NFAT1<sup>+</sup> при ЛЧТЛ и CD3<sup>+</sup>AP-1<sup>+</sup> при ЛУТЛ.

**Практическое и теоретическое значение работы.** Полученные данные расширяют имеющиеся фундаментальные представления об иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, вносят дополнительный вклад в понимание молекулярных механизмов формирования вторичной иммунологической недостаточности и дизрегуляции иммунного ответа в целом при туберкулезе легких. Результаты исследования могут служить основой направленной модуляции иммунного ответа, профилактики и лечения иммунозависимых болезней, а также предпосылкой для разработки новых подходов к патогенетически обоснованной иммунотерапии, направленной на коррекцию нарушений индуктивной фазы иммунного ответа на ранних этапах активации Т-клеток при туберкулезе легких.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. У больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-резистентным туберкулезом легких угнетение базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* сопряжено с дефицитом общего числа CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> и IL-2<sup>+</sup> лимфоцитов и их CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> субпопуляций в крови.
2. Дизрегуляция рецептор-опосредованной активации Т-лимфоцитов при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких определяется как в период формирования иммунологического синапса вследствие дефицита

поверхностных молекул CD3 (TCR), CD28 и CTLA-4-зависимой супрессии сигнала костимуляции, так и на этапе трансдукции активирующего сигнала в связи с недостаточностью в Т-клетках активных форм транскрипционных факторов NF-κB и NFAT2, наиболее выраженной при диссеминированном туберкулезе легких с устойчивостью возбудителя к препаратам этиотропной терапии.

3. CD3/CD28-индукция Т-клеток *in vitro* вызывает разнонаправленные изменения активности транскрипционных факторов NFAT1 и AP-1 у больных туберкулезом легких, проявляющиеся ее увеличением при инфильтративном и снижением при диссеминированном туберкулезе легких.

**Реализация и апробация материала работы.** Основные положения и материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на IX Съезде фтизиатров России (Москва, 2011), XVII и XVIII Межгородских научных конференциях молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2011, 2012), Научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти член-корреспондента РАМН, профессора А.К. Стрелиса «Достижения в лечении множественно лекарственно-устойчивого туберкулеза (10-летний опыт)» (Томск, 2012), Итоговой 71-й студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2012), X Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири» (Красноярск, 2012), X Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Иркутск, 2012), на научно-образовательных семинарах «Патофизиология системы крови и иммунитета» при Центре компетенции по проблеме инфекционных болезней им. И.И. Мечникова и Р. Коха ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2011 – 2012), на научных семинарах кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2011 – 2012).

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ГК №16.512.11.2046 «Разработка комплекса молекулярно-генетических маркеров дизрегуляции иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* для оптимизации диагностики и коррекции вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких», руководитель – профессор О.И. Уразова) и РФФИ (Проект № 11-04-98057-р «Разработка комплекса иммунодиагностических биомаркеров для оптимизации лечения больных туберкулезом легких», руководитель – профессор О.И. Уразова).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 133 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 13 таблицами. Библиографический список

включает 287 наименований, из них 148 отечественных и 139 зарубежных источников.

## **ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В основу работы положены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 109 больных (89 мужчин и 20 женщин) с распространенными деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза легких (ТЛ) в возрасте 20-55 лет. Все пациенты с ТЛ пребывали на стационарном лечении во фтизиотерапевтическом отделении №1 (зав. отд. – А.А. Платоненкова) Томской областной клинической туберкулезной больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова). Пациенты поступали в Томскую областную клиническую туберкулезную больницу из муниципальных бюджетных учреждений поликлинической сети (МБЛПУ) г. Томска и Томской области.

Диагноз ТЛ устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты, которые были получены на базе биохимической, рентгенологической и бактериологической лабораторий Томской областной туберкулезной больницы (зав. лабораторией – Г.Г. Глотова), а также бактериологической лаборатории Томского областного противотуберкулезного диспансера (зав. лабораторией – В.Е. Павлова).

Клиническую форму заболевания устанавливали на основании данных рентгенологического исследования легких. Из 109 обследованных лиц диагноз инфильтративного ТЛ был выставлен 56 (51,38%) пациентам, диагноз диссеминированного ТЛ – 53 (48,62%) больным. Группы больных с инфильтративным и диссеминированным ТЛ дополнительно были разделены на подгруппы в зависимости от чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам (лекарственно-чувствительный (ЛЧТЛ), лекарственно-устойчивый туберкулез легких (ЛУТЛ)).

Критериями исключения пациентов из исследования являлись: возраст больных младше 20 и старше 55 лет, наличие других клиническими форм туберкулезной инфекции, тяжелых сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза, отягощенного аллергологического анамнеза, терапия глюкокортикоидами и иммуномодулирующими препаратами.

Группу сравнения составили 50 практически здоровых доноров (группа здоровья II) в возрасте от 20 до 55 лет. Все лица (37 мужчин и 13 женщин), входящие в контрольную группу, прошли медицинский осмотр на базе МБЛПУ Поликлиника №3 (гл. врач – канд. мед. наук А.В. Михленко). Условиями включения в группу сравнения являлись: отсутствие патологических изменений в легких при флюорографическом исследовании, отсутствие в анамнезе легочной патологии, тяжелых аллергических

реакций, хронических инфекционных заболеваний, заболеваемость острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями не чаще 3-х раз в год, при отсутствии в анамнезе инфекционных заболеваний в течение не менее 3-х месяцев, предшествующих исследованию. Все включенные в исследования добровольцы отрицали наличие в анамнезе аллергических заболеваний, отягощенной наследственности, лекарственной и пищевой аллергии.

Материалом для иммунологического исследования служила периферическая венозная кровь, стабилизированная гепарином (25 Ед/мл). Взятие крови проводили утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл. Исследование проводилось однократно, до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии.

Подсчет общего количества лейкоцитов и их отдельных морфологических форм (лимфоциты, моноциты) осуществляли на гематологическом анализаторе МЕК-6400 (Nihon Kohden, Япония).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992]. Лимфоциты отделяли от моноцитов, основываясь на способности последних к адгезии на стекле и пластике [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992].

Концентрацию жизнеспособных клеток в суспензии определяли с использованием 0,5% раствора трипанового синего [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992].

Специфическую индукцию лимфоцитов осуществляли путем добавления индукторов пролиферативного ответа (моноклональные антитела (МКАТ) к CD3- и CD28-молекулам) и блокатора внутриклеточного транспорта (моненсин) в дозах 1, 4, и 5 мкг/мл соответственно. Время индукции в зависимости от исследуемого параметра составляло: 40 мин (транскрипционные факторы), 10 ч (рецепторные молекулы CD3, CD28 и внутриклеточный IL-2) и 48 ч (рецепторная молекула CTLA-4 и IL-2 *in vitro*).

Определение рецепторных молекул (CD3, CD28, CTLA-4), внутриклеточных транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, NFAT1, NFAT2) и IL-2 в лимфоцитах крови выполняли методом проточной лазерной двухцветной цитометрии с помощью МКАТ, меченных флуоресцентными метками (PerCP, FITC, PE).

Для оценки базальной и CD3/CD28-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* (по содержанию интерлейкина в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов) использовали метод твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» анализа (ELISA).

Обработку полученных результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.». Проверка нормальности распределения выборочных данных осуществлялась с помощью критерия 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 различий между независимыми 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 (при нормальном распределении) и Спирмена (при ненормальном распределении). При уровне значимости  $p \leq 0,05$  различие двух сравниваемых величин считали достоверным [Бронштейн И.Н., Семендяев К.А., 1986; Флейс Дж., 1989; Боровиков В.В., 2001].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В отечественной и зарубежной литературе представлено много работ, посвященных изучению иммунного статуса и эффективности иммунного ответа у больных туберкулезом легких (ТЛ) [Кноринг Б.Е. и соавт., 1999; Хонина Н.А. и соавт., 2000; Ulmer A.J. et al., 2000; Черешнев В.А., 2001; Dantzer R., 2001; Комогорова Б.Э., 2005; Краснов В.А. и соавт., 2005; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Новицкий В.В. и соавт., 2008; Шовкун Л.А., 2008; Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009; Хасанова Р.Р. и соавт., 2009; Шилько Т.А., 2009; Колосова А.Е. и соавт., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2010; 2011]. Это связано, прежде всего, с тем, что состояние факторов иммунологической защиты является решающим при инфицировании, а также определяет характер течения патологического процесса и исход заболевания при развитии туберкулезной инфекции.

В настоящее время среди причин, лежащих в основе развития ТЛ, особое значение отводится комплексу этиологических и патогенетических факторов, обуславливающих нарушение иммунного ответа на *M. tuberculosis* и формирование вторичной иммунологической недостаточности (ВИН), сопровождающей данное заболевание. Наличие ВИН существенно влияет как на течение туберкулезного процесса, так и на качество этиотропной терапии; ее характерной особенностью является дисбаланс в цитокиновой сети, проявляющийся, как правило, гипопродукцией цитокинов, ответственных за «поляризацию» дифференцировки наивных (нулевых) Т-лимфоцитов-хелперов (Th) в Th1-клетки и развитие иммунного Th1-ответа [Чучалин А.Г., 2004]. Наиболее отчетливо с характером течения туберкулезной инфекции связаны изменения секреции интерлейкина (IL) 2, являющегося основным аутокринным фактором роста и активации Т-лимфоцитов и обладающего способностью направлять дифференцировку наивных Т-клеток по Th1-пути. Гипопродукция IL-2, часто регистрируемая при ТЛ, в настоящее время считается основным критерием ВИН и рассматривается среди основных факторов неэффективности иммунного ответа на *M. tuberculosis* [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Лусс Л.В., 2007; Ивашкин В.Т., 2008].

Известно, что основными клетками-продуцентами IL-2 являются активированные

Th1-лимфоциты, на долю которых приходится до 90-95% секретируемого в ходе иммунных реакций IL-2. В этой связи причины дефицита IL-2 напрямую зависят от активации Т-клеток [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Причины снижения активности Th1 могут лежать в нарушении взаимодействия между Т-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками (АРС) [Ивашкин В.Т., 2008; Griffiths G.M., Tsun A., 2011]. Известно, что межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется путем как непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, так и посредством цитокинов [Dustin M.L., 2010; Alarcón B. et al., 2011]. При этом основным механизмом индукции секреции IL-2 принято считать передачу импульсов посредством Т-клеточного рецептора (CD3-TCR) [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Показано, что для активации наивных Т-клеток по Th1-пути необходимо соединение CD3-TCR лимфоцита с комплексом «МНС II+пептид» АРС при участии корецептора CD4 и молекул костимуляции CD28 (на Т-клетках) и CD80/CD86 (на АРС) [Ивашкин В.Т., 2008; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Yokosuka T., Saito T., 2010]. При этом активация костимулирующей молекулы CD28 является обязательным условием для запуска клеточно-опосредованного иммунного ответа. Отсутствие или недостаточная стимуляция через CD28 приводит к активации программы апоптоза и гибели Т-лимфоцита [Ивашкин В.Т., 2008; Gerdes N., Zirlik A., 2011; Lichtman A.H., 2012].

По существующим представлениям, иммунный ответ на *M. tuberculosis* подавляется в связи с активацией Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), оказывающих супрессорное влияние на процессы лимфопролиферации и опосредующих Т-клеточную анергию [Ярилин А.А., 2010; Зурочка А.В., 2011; Симбирцев А.С., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2010; 2011; Sakaguchi S., 2011]. При этом большое значение придается присутствию на поверхности Treg-лимфоцитов ингибитора костимуляции – молекулы CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), поскольку именно с этой молекулой связывают реализацию их иммуносупрессорной функции [Сахно Л.В., 2004; Ярилин А.А., 2010]. Среди основных эффектов супрессии выделяют способность CTLA-4, обладающей высокой авидностью к молекулам CD80/CD86 на АРС, предотвращать их костимулирующее действие через CD28-молекулу и, таким образом, подавлять активацию Th1-клеток [Казимирский А.Н., 2006].

Исходя из этого, нами была предпринята попытка оценить секрецию IL-2 при специфической индукции лимфоцитов, имитирующей взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами *in vitro*, и выявить возможные нарушения процессов межклеточной кооперации на уровне Т-клеточного рецептора и молекул костимуляции.

Анализ цитокинсекреторной активности показал, что у больных ТЛ отмечается гипосекреция IL-2 лимфоцитами крови как в спонтанных условиях (базальная), так и при CD3/CD28-индукции клеток, наиболее выраженная при ЛУТЛ (базальная при

диссеминированной его форме, индуцированная – при инфильтративной) (таблица 1). При этом было отмечено снижение относительного и абсолютного числа CD3-, CD28- и IL-2-позитивных лимфоцитов у больных как ЛЧТЛ, так и ЛУТЛ относительно соответствующих показателей у здоровых доноров, наиболее выраженное в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ. Кроме того, у больных ТЛ было зарегистрировано изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, которое проявлялось снижением числа CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup> и увеличением содержания CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup> лимфоцитов, а также повышением количества иммуносупрессорных CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток на фоне выраженной Т-лимфоцитопении. Наиболее значительные их изменения обнаруживались у пациентов с лекарственно-устойчивым вариантом туберкулезной инфекции (рисунок 1, 2).

Таблица 1

Секреция IL-2 лимфоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		Базальная секреция, пг/мл	CD3/CD28-индуцированная секреция, пг/мл
Здоровые доноры		12,81 (11,26-15,57)	35,88 (32,39-44,15) p <sub>4</sub> <0,001
Больные инфильтративным туберкулезом легких	ЛЧТЛ	8,73 (6,46-13,42) p <sub>1</sub> <0,05	13,45 (10,62-18,09) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,01
	ЛУТЛ	6,24 (4,58-9,13) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>3</sub> <0,01	8,80 (7,80-12,51) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>3</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,01
Больные диссеминированным туберкулезом легких	ЛЧТЛ	7,62 (7,00-8,94) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,05	23,74 (20,62-27,88) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>4</sub> <0,001
	ЛУТЛ	3,56 (3,13-4,77) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,001	12,56 (11,59-16,68) p <sub>1</sub> <0,001; p <sub>2</sub> <0,01; p <sub>3</sub> <0,001; p <sub>4</sub> <0,001

Примечание. ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких; p<sub>1</sub> – по сравнению с показателями у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – по сравнению с показателями у больных с ЛЧТЛ (внутри каждой клинической формы); p<sub>3</sub> – по сравнению с показателями у больных с инфильтративным ТЛ; p<sub>4</sub> – по сравнению с показателями базальной секреции (без использования индукторов).

Угнетение IL-2-секреторной активности Т-лимфоцитов, установленное в настоящем исследовании, во многом определяется снижением количества данной субпопуляции клеток. Уменьшение общего числа CD3-позитивных лимфоцитов может быть связано как с непосредственной гибелью клеток в очаге воспаления в легких, что приводит к ускоренной миграции Т-клеток из периферической крови [Сахно Л.В., 2004], так и, как уже указывалось выше, с запуском программы их апоптоза [Ивашкин

В.Т., 2008].

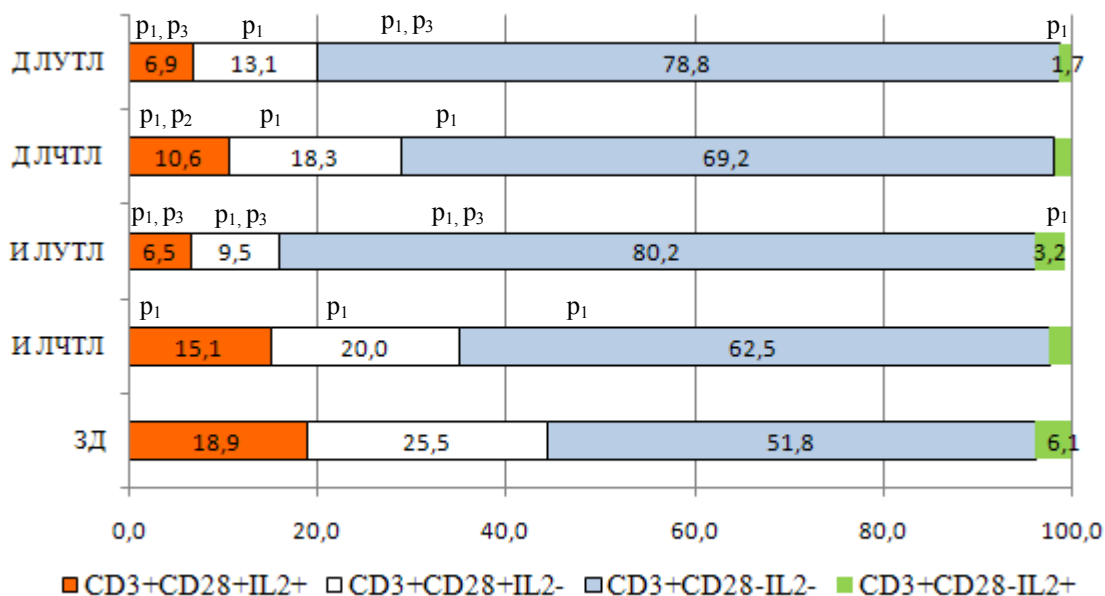


Рисунок 1. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Примечание. ЗД – здоровые доноры; И ЛЧТЛ – инфильтративный лекарственно-чувствительный туберкулез легких; И ЛУТЛ – инфильтративный лекарственно-устойчивый туберкулез легких; Д ЛЧТЛ – диссеминированный лекарственно-чувствительный туберкулез легких; Д ЛУТЛ – диссеминированный лекарственно-устойчивый туберкулез легких.

В качестве ключевых факторов активации апоптоза при действии на макроорганизм инфекционных агентов в настоящее время рассматриваются нерепарируемые повреждения и рецептор-зависимая селекция клеток. Так, было показано, что Т-клеточный дефицит при туберкулезе может быть обусловлен индуцированной возбудителем дезорганизацией хромосомного аппарата лимфоцитов и систем, обеспечивающих генетический гомеостаз макроорганизма. При этом угнетение индекса стимуляции ДНК-репарации в лимфоцитах крови при туберкулезе связывают с инфекционно-токсическим их повреждением, которое может быть одной из причин запуска Fas-индуцированного апоптоза и снижения численности данной популяции клеток [Ивашкин В.Т., 2008; Шилько Т.А., 2009; Уразова О.И., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2011].

Немалая роль в регуляции клеточной гибели принадлежит также фактору некроза опухолей (TNF)  $\alpha$ , являющемуся ключевым регулятором иммунного ответа [Биктасова А.К., 2010; Ярилин А.А., 2010]. В условиях туберкулезной инфекции TNF- $\alpha$ -опосредованная гибель иммунокомпетентных клеток может иметь доминирующее значение в развитии Т-клеточного дефицита в виду индуцированной *M. tuberculosis* гиперсекреции данного цитокина [Воронкова О.В., 2007; Серебрякова В.А., 2011].

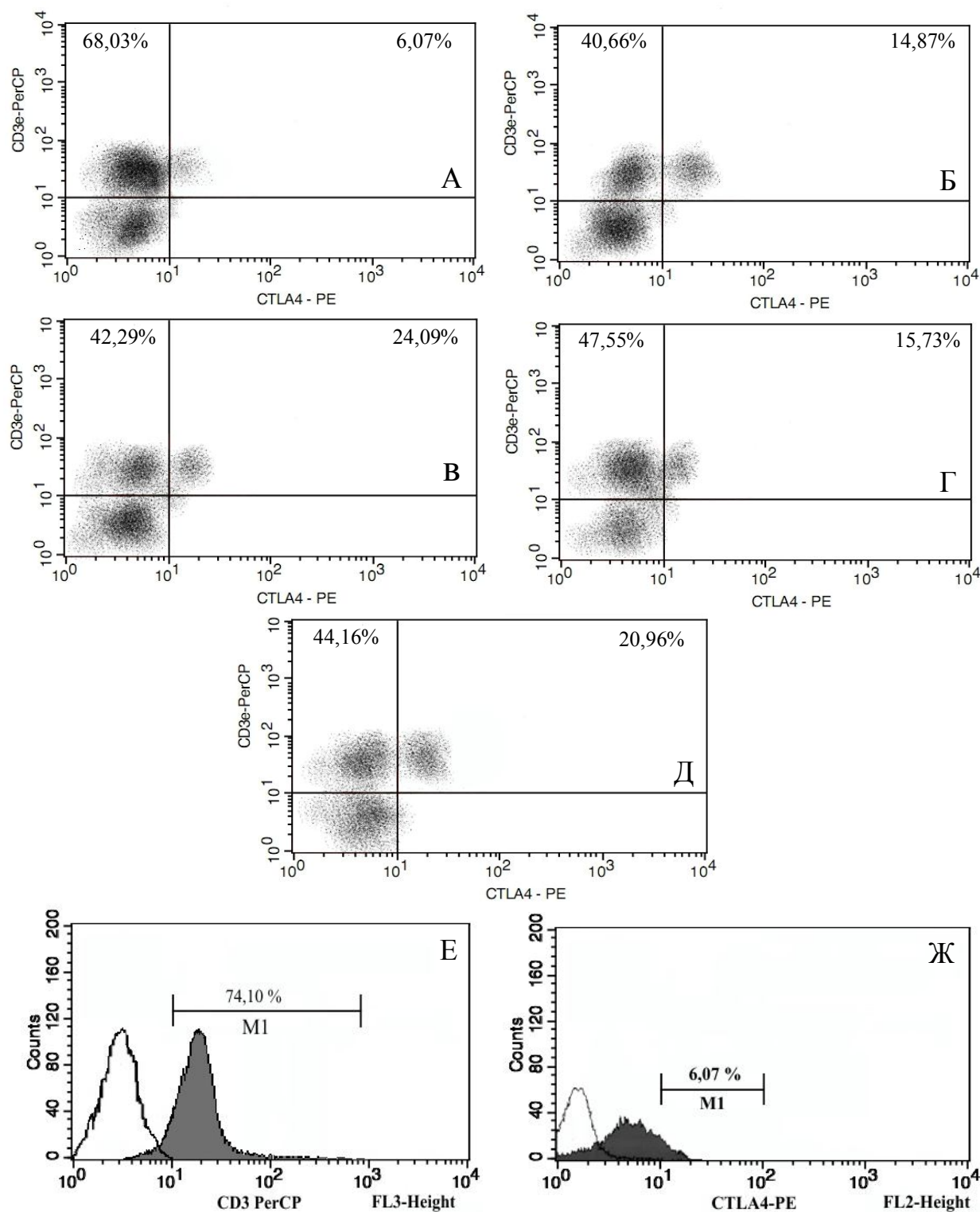


Рисунок 2. Количество CD3-позитивных клеток, экспрессирующих CTLA-4, в условиях действия индукторов (антиCD3, антиCD28 антитела) *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких (по данным проточной цитофлуориметрии)

Примечание. Данные представлены на примере наиболее показательных индивидуальных гистограмм распределения лимфоцитов крови по параметрам флуоресценции при окраске антителами к CD3 (PerCP) и CTLA-4 (PE) у здорового донора (А) и пациентов с инфильтративным лекарственно-чувствительным (Б) и лекарственно-устойчивым (В) туберкулезом легких, диссеминированным лекарственно-чувствительным (Г) и лекарственно-устойчивым (Д) туберкулезом легких; Е, Ж – изотипический контроль флуоресценции.

Известно, что CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты являются более чувствительными к активации апоптоза за счет высокой экспрессии ими рецепторов FasR и TNFR1 и подавления активности антиапоптотических генов семейства bcl-2 [Пичугин А.В., Апт А.С., 2005; Ивашкин В.Т., 2008; Тюлькова Т.Е. и соавт., 2008; Ярилин А.А., 2010].

Кроме того, в индуктивной фазе иммунного ответа путем апоптоза удаляются Т-лимфоциты, не получившие адекватного костимуляторного сигнала при взаимодействии антигенспецифического рецептора с презентруемым антигеном. Активация процесса апоптоза в данном случае зависит от NFAT1-индуцированной экспрессии апоптотического фактора FasL в ответ на неадекватный антигенный стимул, определяющий гибель Т-клетки [Сибиряк С.В. и соавт., 2006; Gwack Y. et al., 2007]. В пользу данного предположения может свидетельствовать зарегистрированное в настоящем исследовании снижение относительного числа CD28-позитивных Т-лимфоцитов у больных ТЛ, максимально выраженное при ЛУТЛ (рисунок 1).

Однако следует отметить, что гипопродукция IL-2, а также снижение числа CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ТЛ могут быть обусловлены анергией Т-клеток. Выявленное у больных ТЛ увеличение содержания CD28<sup>-</sup>IL2<sup>-</sup> и CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток на фоне выраженной Т-лимфоцитопении и гипосекреции IL-2, вероятно, связано с увеличением количества и функциональной активности Т-регуляторных клеток, способных супрессировать процессы лимфопрлиферации, вызывая развитие гипо- и анергии Т-лимфоцитов [Чурина Е.Г. и соавт., 2010; 2011].

Таким образом, у больных ТЛ отмечается существенное снижение числа Т-лимфоцитов, гипосекреция IL-2 при CD3/CD28-индукции и изменение процентного соотношения субпопуляций CD3-позитивных клеток, проявляющееся снижением IL-2-синтезирующих (IL-2<sup>+</sup>) Т-клеток, увеличением числа CD28- и IL-2-негативных лимфоцитов, а также CD3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> клеток. Выявленные изменения носят в большей степени однонаправленный характер и максимально выражены у пациентов с лекарственно-резистентным вариантом туберкулезной инфекции. Учитывая, что передача активационного сигнала в процессе межклеточной кооперации, опосредованная Т-клеточным рецептором и костимуляцией через CD28, является одним из ключевых моментов формирования противотуберкулезного иммунитета, выявленные изменения в Т-лимфоцитах при ТЛ могут свидетельствовать о неспособности Т-клеток эффективно отвечать на антигенный стимул, что приводит к выраженной гипосекреции IL-2.

Как уже отмечалось ранее, активация CD3-TCR лимфоцита при участии корецептора CD4 и костимулирующей молекулы CD28 на Т-клетках приводит к запуску механизмов сигнальной трансдукции, конечным итогом которых (применительно к Th1-ответу) является секреция IL-2 и экспрессия его поверхностного рецептора [Bromley S.K. et al., 2001; Пименов А.А. и соавт., 2003; Ярилин А.А., 2003; Wang H. et al., 2005; Ивашкин В.Е., 2008]. Активация CD3-TCR/CD28 приводит к запуску цепочки тирозиновых киназ Fyn, Lck, ZAP70, вызывающих расщепление

фосфатидилинозитолдифосфата с образованием диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Последний высвобождает из внутриклеточных депо  $Ca^{2+}$ , необходимый для активации кальциневрина, который, в свою очередь, дефосфорилирует цитоплазматическую форму ядерного фактора транскрипции NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), способствуя, тем самым, его транслокации в ядро. Диацилглицерол активирует протеинкиназу C и белок Ras. Последний способствует фосфорилированию протеинкиназы Raf, запускающей сигнальный каскад митоген-активированных белков (МАРК и МАРКК (Мек)). Активная протеинкиназа C при помощи Carma-1 (caspase-recruitment-domain-containing membrane-associated guanylate kinase 1) связывается с фосфорилированным белком Bcl-10. Протеин Bcl-10 взаимодействует с каспазоподобной протеазой MALT-1, которая в последующем активирует комплекс I $\kappa$ B-киназа (ИКК). Следствием является фосфорилирование ингибитора  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) по двум близкорасположенным остаткам серина (32 и 36), что служит сигналом для убиквитинации и последующей деградации молекулы I $\kappa$ B в 26S-протеосомах с освобождением из связи с ингибитором фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. Параллельно этому в каскаде МАР-киназ активируются ядерная форма транскрипционного фактора (ТФ) NFAT (NFATn). Совместное действие ядерных факторов NFATc, NFATn, объединенных в полноценный транскрипционный фактор NFATc/n, и NF- $\kappa$ B включает в ядре «ранние гены» клеточной пролиферации Fos и Jun и промотор AP-1, который (взаимодействуя с NFAT) активирует транскрипцию генов IL-2 (IL2) и его рецептора (CD25) [Kintzel P.E., Calis K.A., 1991; Chang C.P. et al., 2004; Hayden M.S., Ghosh S., 2004; Monaco C. et al., 2004; Macian F., 2005; Абатуров А.Е., 2006; 2007; Gilmore T.D., 2006; Ивашкин В.Е., 2008; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Hayden M.S., Ghosh S., 2008; Зенин В.В. и соавт., 2009].

Таким образом, ключевыми звеньями в механизмах трансдукции сигнала стимуляции секреции основного Th1-ассоциированного цитокина – IL-2, является активация ТФ NF- $\kappa$ B, AP-1 и NFAT. С этих позиций было проанализировано количество CD3-позитивных лимфоцитов, содержащих активные формы указанных ТФ в условиях CD3/CD28-индукции клеток *in vitro*.

Как показали результаты проведенного исследования, у больных ТЛ отмечается снижение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>NF- $\kappa$ B<sup>+</sup> лимфоцитов относительно показателей у здоровых доноров, наиболее выраженное при диссеминированной форме ЛУТЛ. При этом количество CD3<sup>+</sup>AP-1<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ЛЧТЛ оставалось в пределах нормы, повышалось у больных инфильтративным ЛУТЛ и снижалось при диссеминированной его форме (рисунок 3).

Низкая активность NF- $\kappa$ B и AP-1 при ТЛ, вероятно, связана с недостаточностью активационного сигнала, обусловленной снижением экспрессии молекулы костимуляции CD28, а также увеличением супрессорного влияния CTLA-4-молекулы, согласно выявленному у пациентов с ТЛ повышению численности экспрессирующих ее Т-клеток.

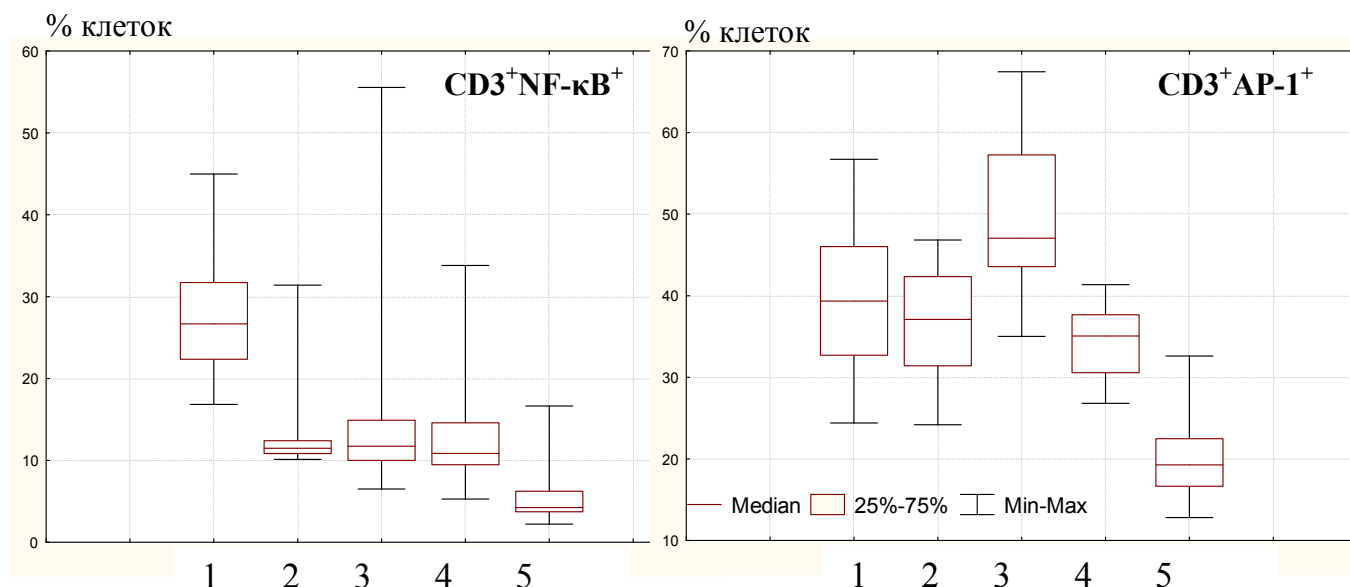


Рисунок 3. Относительное содержание NF-κB- и AP-1-позитивных Т-клеток в культуре лимфоцитов в условиях действия индукторов (антиCD3-, антиCD28-антитела) *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Примечание. Здесь и на рисунке 4: 1 – здоровые доноры; 2 – больные инфильтративным лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; 3 – больные инфильтративным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких; 4 – больные диссеминированным лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; 5 – больные диссеминированным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.

Среди вариантов инактивации сигнальных каскадов, опосредованных CTLA-4, рассматривают негативное его влияние на активность IκB-киназ, в результате которого нарушаются процессы фосфорилирования IκB и освобождения активного гетеродимера NF-κB [Olsson C. et al., 1999; Dias S.R., Rudd C.E., 2001; Абатуров А.Е., 2006; Меньшикова Е.Б. и соавт., 2006; Mukherjee S. et al., 2006; Маянский А.Н. и соавт., 2007; Абатуров А.Е., 2008; Goronzy J., Weyand C., 2008; Ahmed A., 2009]. Зарегистрированный в настоящем исследовании дефицит CD28-позитивных Т-лимфоцитов на фоне увеличения числа CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток, вероятно, может являться причиной низкой активности NF-κB и снижения численности субпопуляции NF-κB<sup>+</sup> Т-клеток.

Известно, что ТФ NF-κB и AP-1 являются редокс-чувствительными и отвечают за изменение окислительно-восстановительного баланса клетки, индикатором которого служит соотношение про- и антиоксидантов. Активация процессов свободнорадикального окисления служит своего рода индуктором ТФ NF-κB и AP-1. С другой стороны, антиоксиданты (каталаза, супероксиддисмутаза (СОД), глутатион), являются ингибиторами транскрипционной активности. В исследованиях показано, что активность NF-κB резко блокируется в присутствии ацетилцистеина, глутатиона, СОД [Долинная Н.Г. и соавт., 2008]. Вместе с тем, установлено, что у больных ТЛ отмечаются высокие значения активности СОД в лимфоцитах крови независимо от



клинической формы заболевания при ЛЧТЛ, а также у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ [Есимова И.Е., 2007; Шилько Т.А., 2009]. Вероятно, этим фактом можно объяснить выявленное нами низкое содержание NF-κB<sup>+</sup> и AP-1<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у пациентов с диссеминированной формой ЛУТЛ.

Не исключено, что снижение числа NF-κB-позитивных Т-лимфоцитов может быть обусловлено угнетением синтеза субъединиц ТФ, связанным с нарушениями процессов биосинтеза белка при ТЛ [Ing R. et al., 2000; Poddar M.K. et al., 2000; Перельман М.И., 2007].

Высокий уровень CD3<sup>+</sup>AP-1<sup>+</sup> лимфоцитов, выявленный у больных инфильтративным ЛУТЛ, на фоне снижения числа CD3<sup>+</sup>NF-κB<sup>+</sup> клеток, по всей видимости, свидетельствует о реализации альтернативных путей активации «ранних генов» клеточной пролиферации Fos и Jun и промотора AP-1, не связанных с NF-κB (рисунок 3).

Кроме того, была показана ингибирующая роль глюкокортикостероидов (ГКС) на активность ТФ NF-κB, AP-1, NFAT [Абатуров А.Е., 2008]. ГКС, проникая в цитоплазму клетки, взаимодействуют с гормонсвязывающим доменом С-конца изоформы α глюкокортикостероидного рецептора (GR), локализованного в цитоплазме и представляющего собой мультикомплекс. ГКС-активированный GR оказывает ингибирующее влияние на MAPK-, MAPKK- и IκB-киназы, активирует синтез белков IκB, взаимодействует с субъединицами p50 и p65 NF-κB (и, вероятно, с-Jun AP-1), подавляя их транскрипционную активность [Абатуров А.Е., 2008]. Высокие концентрации ГКС могут вносить определенный вклад в формирование дефицита NF-κB- и AP-1-позитивных Т-клеток при ТЛ.

Как уже отмечалось, еще одним важным ТФ, оказывающим влияние на промотор гена *IL2* и синтез одноименного цитокина, является NFAT. Для зрелых Т-лимфоцитов характерно присутствие двух цитоплазматических форм NFAT – NFAT1, NFAT2. Блокада экспрессии NFAT в Т-лимфоцитах сопровождается снижением активности IL-2-промотора и угнетением синтеза цитокина [Pongracz J.E., Stockley R.A., 2006; Felix N.J. et al., 2010; Walsh N.P. et al., 2011; Poirier N. et al., 2011; Zelante T., 2012]. Считается, что промотор гена *IL2* низко селективен в отношении ТФ NFAT, однако существует мнение, что NFAT2 является наиболее эффективным активатором транскрипции гена *IL2*. Блокада гена *NFAT2* сопровождается снижением пролиферативного ответа Т-лимфоцитов, в то время как отмена экспрессии NFAT1, напротив, приводит к усилению спонтанной и антиген-стимулированной Т- и В-клеточной пролиферации с повышением доли активированных клеток в обеих популяциях [Arguni E. et al., 2006; Абатуров, А.Е., 2007; Oh-hora M., Rao A., 2009; Kang H., 2010].

Измерение количества Т-лимфоцитов, содержащих активную форму NFAT2, позволило установить снижение (ниже нормы) процентного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>NFAT2<sup>+</sup> клеток у больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ (рисунок 4). Исключение составили

пациенты с инфильтративным ЛУТЛ, у которых численность данной субпопуляции Т-лимфоцитов не отличалась от нормальных величин и была значимо выше аналогичных показателей в других обследуемых группах (рисунок 4). В то же время, количественный анализ Т-клеток, содержащих активную форму NFAT1, позволил зарегистрировать существенное увеличение относительного и абсолютного числа  $CD3^+NFAT1^+$  лимфоцитов у больных инфильтративным ЛУТЛ и низкие показатели численности  $CD3^+NFAT1^+$  клеток при диссеминированном ЛЧТЛ. При остальных формах ТЛ количество  $CD3^+NFAT1^+$  лимфоцитов оставалось в пределах нормы (рисунок 4).

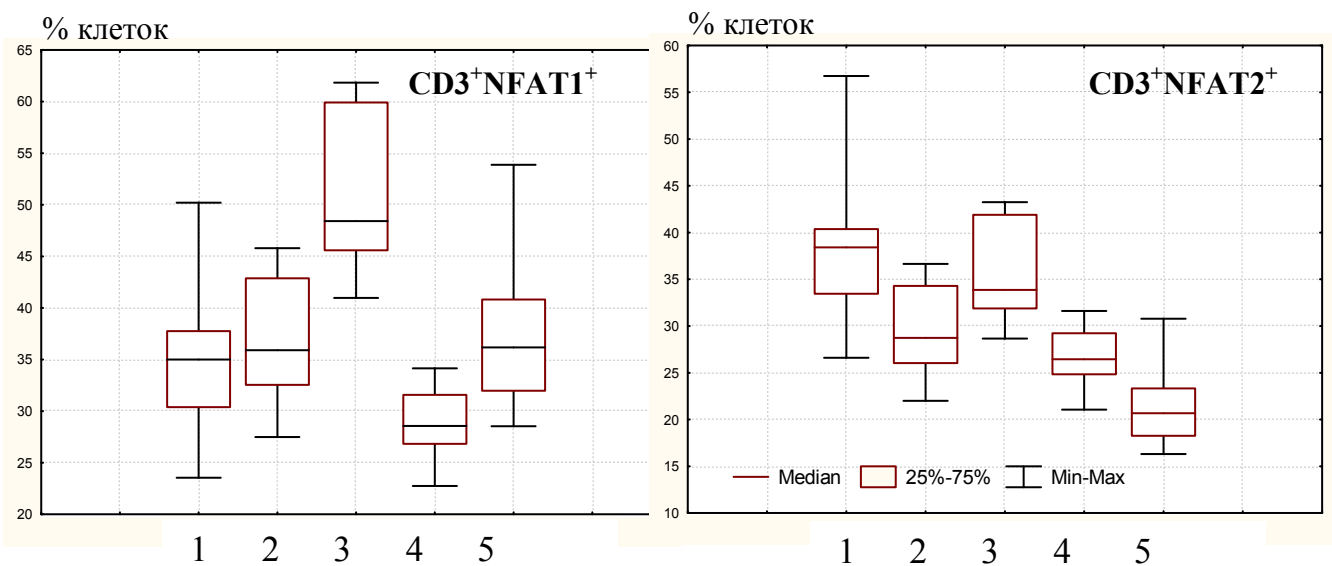


Рисунок 4. Относительное содержание NFAT1- и NFAT2-позитивных Т-клеток в культуре лимфоцитов в условиях действия индукторов (антиCD3-, антиCD28-антитела) *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Установленные нарушения могут быть связаны с недостатком активной формы NFAT2 в цитозоле клеток в результате снижения ее синтеза, сопряженного с дефицитом биосинтеза белка, характерного для ТЛ [Ing R. et al., 2000; Poddar M.K. et al., 2000; Перельман, М.И., 2007]. Снижение числа NFAT2-позитивных Т-лимфоцитов может быть обусловлено активацией СОД в клетках, оказывающей негативное влияние на активность NFAT2. Косвенно, в пользу данного предположения свидетельствует установленный в более ранних работах высокий уровень активности СОД при инфильтративном и диссеминированном ЛЧТЛ и диссеминированной форме ЛУТЛ [Есимова И.Е., 2007; Шилько Т.А., 2009]. Именно при этих формах ТЛ определялось снижение числа  $CD3^+NFAT2^+$  клеток в настоящем исследовании. При этом инфильтративный ЛУТЛ, по данным Т.А. Шилько [2009], характеризуется нормальными показателями активности СОД. В настоящем исследовании численность NFAT2-позитивных Т-лимфоцитов при данной форме ТЛ оставалась в пределах нормы.

Кроме того, нельзя исключить и влияние высоких доз ГКС, регистрируемых при

ТЛ, на снижение количества NFAT2<sup>+</sup> Т-клеток [Абатуров А.Е., 2008].

Уменьшение содержания NFAT1-позитивных Т-лимфоцитов у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ, вероятно, связано с теми же причинами, что и снижение числа CD3<sup>+</sup>NFAT2<sup>+</sup> клеток.

Выявленное в работе повышенное содержание NFAT1-позитивных Т-лимфоцитов при инфильтративном ЛУТЛ может свидетельствовать об усилении активности данного ТФ. Так, было показано, что при инфильтративной форме ЛУТЛ лимфоциты характеризуются наиболее высоким содержанием фосфатидилинозитола в мембране клеток и высоким уровнем внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Кроме того, как уже было отмечено, при данной форме ТЛ регистрируются нормальные показатели активности ферментов антиоксидантной защиты [Есимова И.Е., 2007; Шилько Т.А., 2009]. Известно, что фосфатидилинозитол является предшественником вторичных мессенджеров – диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Инозитолтрифосфат регулирует Ca<sup>2+</sup>-зависимую активацию кальциневрина, который, в свою очередь, является прямым активатором NFAT [Chang C. et al., 2004; Hayden M., Ghosh S., 2004; Monaco C. et al., 2004; Macian F., 2005; Gilmore T.D., 2006; Ивашкин В.Е., 2008; Hayden M., Ghosh S., 2008; Зенин В.В. и соавт., 2009]. В данной ситуации вероятным механизмом активации NFAT1 и, соответственно, регистрируемого увеличения числа CD3<sup>+</sup>NFAT1<sup>+</sup> клеток, может являться повышенная активность кальциневрина. При этом можно предположить, что преимущественная в данной ситуации активация NFAT1, а не NFAT2, связана с низким содержанием последнего в цитозоле клеток.

Особое внимание обращало на себя соотношение NFAT1/NFAT2-позитивных Т-лимфоцитов при туберкулезной инфекции. Так, например, известно, что NFAT1-белок участвует в негативном контроле пролиферации Т-лимфоцитов за счет инициации экспрессии FasL [Gómez-Sintes R. et al., 2010; Alvarez S. et al., 2011]. Увеличение числа Т-лимфоцитов, содержащих активную форму NFAT1, у больных инфильтративным ЛУТЛ в сочетании с нормальным количеством NFAT2<sup>+</sup> клеток, вероятно, оказывает негативное влияние на количество CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, что, возможно, вносит вклад в снижение численности CD3-субпопуляции клеток при данной форме ТЛ и снижение их IL-2-секреторной функции.

Кроме того, показана способность NFAT2 и NFAT1 (в комплексе друг с другом) существенно усиливать транскрипцию гена *IL4* на начальных этапах активации, взаимодействуя с пурин-богатыми последовательностями промотора, с последующим NFAT2-ингибированием на поздней фазе транскрипции гена *IL4* [Zádor E., 2008; Zhang Y. et al. 2009; Lee S.H. et al., 2009; Lohoff M. et al., 2010; Saito R. et al., 2011]. Снижение количества CD3<sup>+</sup>NFAT2<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ТЛ при нормальном или увеличенном содержании CD3<sup>+</sup>NFAT1<sup>+</sup> клеток позволяет предположить дезинтеграцию в работе изучаемых ТФ, приводящую, по всей видимости, к нарушению ингибирования поздней фазы транскрипции гена *IL4*, увеличению IL4-продуцирующей активности Т-клеток и переключению их активации с Th1- на Th2-иммунный ответ. Это также может вносить

определенный вклад в гипопродукцию IL-2.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что при ТЛ нарушение взаимодействия APC и Т-лимфоцитов, приводящее к низкой IL-2-секреторной активности, гипо- и анергии Т-клеток, является комплексным, многоуровневым и обуславливается как влиянием супрессорных механизмов (в том числе посредством CTLA-4), так и дефицитом CD28-костимуляции и нарушением процессов сигнальной трансдукции в лимфоцитах крови вследствие снижения числа Т-клеток, содержащих активные формы внутриклеточных транскрипционных факторов (NF-κB, NFAT2, AP-1) (рисунок 5). Это, несомненно, расширяет имеющиеся фундаментальные представления о патогенезе туберкулезной инфекции и, возможно, послужит основой модуляции иммунного ответа, профилактики и лечения иммунозависимых болезней.

## ВЫВОДЫ

1. При инфильтративном и диссеминированном лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких гипосекреция *in vitro* IL-2 (фактора роста и активации Т-клеток), характеризующая состояние гипозергии Т-клеточного звена иммунитета, определяется дефицитом общего числа CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> лимфоцитов и их CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> субпопуляций на фоне повышения количества CD3<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>IL2<sup>-</sup> Т-лимфоцитов в крови.
2. Снижение секреции IL-2 и количества IL-2<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в условиях рецептор-опосредованной индукции *in vitro* у больных туберкулезом легких ассоциировано с повышением абсолютного и относительного числа клеток, экспрессирующих цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4) с иммуносупрессорной активностью.
3. Изменения рецептор-экспрессирующей и IL-2-продуцирующей активности Т-клеток у больных туберкулезом легких (ТЛ) варьируют в зависимости от клинической формы заболевания с большей выраженностью дефицита CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> лимфоцитов в крови и базальной секреции IL-2 при диссеминированном лекарственно-устойчивом ТЛ (ЛУТЛ), а гипосекреции IL-2 при CD3/CD28-индукции *in vitro* – при инфильтративном ЛУТЛ.
4. Дизрегуляция трансдукции сигнала рецептор-опосредованной активации Т-лимфоцитов при индукции антиCD3- и антиCD28-антителами *in vitro* у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких определяется дефицитом в клетках активных форм транскрипционных факторов NF-κB и NFAT2, наиболее выраженным при диссеминированном туберкулезе легких с устойчивостью возбудителя к препаратам этиотропной терапии.



5. Инфильтративный лекарственно-устойчивый туберкулез легких (ЛУТЛ) сопровождается увеличением числа Т-лимфоцитов, содержащих активные формы транскрипционных факторов NFAT1 и AP-1, в то время как диссеминированный туберкулез легких сопровождается снижением количества клеток с иммунофенотипами CD3<sup>+</sup>NFAT1<sup>+</sup> (при лекарственно-чувствительном его варианте) и CD3<sup>+</sup>AP-1<sup>+</sup> (при ЛУТЛ).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Писаренко, М.С. Роль полиморфизма гена IL-12B в цитокинзависимой активации Т-хелперов 1 типа у больных инфильтративным туберкулезом легких [Текст] / М.С. Писаренко, А.А. Кошкина // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVII Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2011. – С. 126-127.
2. Клинико-иммунологическая характеристика Beijing-туберкулеза в Томской области [Текст]: материалы IX Съезда фтизиатров России / О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, О.И. Уразова, З.К. Хаитова, И.Е. Есимова, А.А. Кошкина // Туберкулез и болезни легких, 2011. – №4. – С. 96.
3. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью [Текст]: материалы IX Съезда фтизиатров России / Р.Р. Хасанова, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, З.К. Хаитова, И.Е. Есимова, А.А. Кошкина // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – №5. – С. 209-210.
4. Продукция интерлейкина-2 лимфоцитами периферической крови у больных туберкулезом легких в условиях CD3/CD28 индукции *in vitro* [Текст] / А.А. Кошкина, М.С. Писаренко, И.Е. Есимова // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVIII Межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2012. – С. 74-76.
5. Писаренко, М.С. Т-клеточные механизмы нарушений индуктивной фазы иммунного ответа при туберкулезе легких [Текст] / М.С. Писаренко, А.А. Кошкина // Материалы Всероссийской 71-й итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова / СибГМУ; под ред. В.В. Новицкого, Н.В. Рязанцевой. – Томск, 2012. – С. 57-58.
6. Причины дизрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунитета [Текст] / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, А.А. Кошкина, Чурина Е.Г. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2012. – №3. – С. 79-86.
7. Кошкина, А.А. Субпопуляционный состав CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов крови и особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина 2 у больных туберкулезом легких [Текст] / А.А. Кошкина, М.С. Писаренко, И.Е. Есимова // Актуальные

- вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири: материалы X Научно-практической конференции молодых ученых. – Красноярск, 2012. – С. 26-30.
8. Особенности CD3/CD28-индуцированной секреции интерлейкина 2 и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких [Текст] / *А.А. Кошкина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, И.Е. Есимова, Р.Р. Хасанова* // **Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН.** – 2012. – №3, ч.2. – С. 92-95.
  9. Кошкина, А.А. Механизмы дизрегуляции рецепторопосредованной сигнальной трансдукции в Т-лимфоцитах крови при туберкулезе легких [Текст] / *А.А. Кошкина* // **Фундаментальные исследования.** – 2012. – №8, ч.1. – С. 91-95.
  10. Причины дизрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: роль нарушений исходного состояния иммунологической реактивности организма [Текст] / *И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, А.А. Кошкина, Е.Г. Чурина* // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2012. – №4. – С. 93-98.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких

ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких

ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких

ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких

ТЛ – туберкулез легких

ТФ – транскрипционный фактор

AP-1 – Activator Protein 1 – активирующий протеин 1

APC – Antigen-presentation Cell – антигенпрезентирующая клетка

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4

IL – Interleukin – интерлейкин

NFAT – Nuclear Factor of Activated T Cells – ядерный фактор активированных Т-клеток

NF-κB – Nuclear Factor κB – ядерный транскрипционный фактор κB

TCR – T-Cell Receptor – Т-клеточный рецептор

Th – T-helper – Т-хелпер

Treg – Т-регуляторный лимфоцит

Подписано в печать 24.09.2012г.

Усл. печ. листов 0,75. Печать на ризографе.

Отпечатано в лаборатории оперативной печати СибГМУ

634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08

Заказ № 217 Тираж 100 экземпляров.