

На правах рукописи

Игнатов Максим Вадимович

**ФАКТОРЫ АКТИВАЦИИ Th17-ЛИМФОЦИТОВ
У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

ТОМСК – 2016

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

Научные руководители:

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

Новицкий
Вячеслав Викторович

доктор медицинских наук, профессор

Уразова
Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующая кафедрой биологической химии
с курсом медицинской, фармацевтической
и токсикологической химии
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный
медицинский университет им. проф.
В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Салмина
Алла Борисовна

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

Таширева
Любовь Александровна

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится: «___» _____ 2016 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В соответствии с современными представлениями, важнейшим звеном иммунной дисфункции при туберкулезе легких (ТЛ) служит дефект клеточного звена иммунитета, основная роль в реализации которого принадлежит Т-хелперам (Th) типа 1, эффекторным Т-лимфоцитам и макрофагам [Sasindran S.J., Torrelles J.B., 2011; Schwander S., Dheda K., 2011; Lyadova I., 2012; Zuñiga J. et al., 2012]. Однако в формировании эффективной противотуберкулезной защиты следует учитывать и другие субпопуляции лимфоцитов, которые могут являться активными участниками воспалительной реакции, формирующейся в легких [Marwaha A.K. et al., 2012; Bedoya S.K. et al., 2013; Qu N. et al. 2013].

В последние годы особое внимание исследователи уделяют изучению роли различных субпопуляций Т-хелперов в патогенезе иммунозависимых заболеваний. До недавнего времени Т-хелперы были разделены на Th1- и Th2-клетки в зависимости от спектра продуцируемых ими цитокинов. В последние же годы появилось все больше свидетельств в пользу того, что данной концепции недостаточно, чтобы описать весь спектр патологических процессов в организме. Взаимоотношения между клетками иммунной системы в реальности являются более сложными и вовлекают множество клеточных реакций и взаимодействий, которые прежде оставались за пределами внимания исследователей. На сегодняшний день обнаружена и охарактеризована субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин (IL) 17, которая получила название Th17 [Зурочка А.В., Хайдуков С.В., 2011; Кологривова И.В. и соавт., 2011].

Известно, что Th17 являются важными клетками в защите хозяина от некоторых микробов, таких как внеклеточные бактерии и грибы. В последнее время они привлекли особое внимание в первую очередь потому, что оказались главными посредниками в патогенезе ряда воспалительных, в том числе аутоиммунных процессов. Вместе с тем имеются основания утверждать, что Th17 обладают также протективным действием против внутриклеточных патогенов [Wang G.Q. et al., 2014; Busman-Sahay K.O. et al., 2015], в том числе *Mycobacterium tuberculosis* [George P.J. et al., 2014; de Oliveira L.R. et al., 2014]. Установлено, что Th17 вырабатывают значительные количества провоспалительных цитокинов – IL-17, IL-22, IL-26 и фактор некроза опухоли (TNF) α , а их дифференцировка и активность во многом зависят от концентрации IL-1 β , IL-6 и трансформирующего фактора роста (TGF) β , секретируемых мононуклеарными лейкоцитами крови, а также от содержания IL-23, являющегося продуктом дендритных клеток [Ye Z.J. et al., 2011; Zambrano-Zaragoza J.F. et al., 2014]. С другой стороны, существует мнение о том, что при внутриклеточных инфекциях Th17-ответ носит скорее патологический, нежели протективный характер, поскольку ингибирует апоптоз инфицированных клеток и способствует персистенции возбудителя [Дьяченко П.А., Дьяченко А.Г., 2010].

Таким образом, несмотря на всю важность и функциональную значимость Th17-лимфоцитов, их клиническое значение и регуляторные механизмы в

развитии туберкулеза легких пока не объяснены.

В связи с вышеизложенным, изучение роли Th17-клеток в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции представляет бесспорный научный интерес в отношении раскрытия новых механизмов реализации иммунного ответа против *M. tuberculosis*, и может служить основой для разработки новых методов иммунодиагностики и иммунокоррекции.

Степень разработанности темы исследования. В условиях несомненной важности Th1-лимфоцитов в реализации эффективного клеточно-опосредованного противотуберкулезного иммунитета основное внимание исследователей направлено на оценку именно данного типа клеток, тогда как практически неисследованными остаются другие субпопуляции Т-хелперов, в частности Th17-лимфоциты, которые могут вносить определенный вклад в иммунный ответ против *M. tuberculosis* в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.

Th17-лимфоциты выполняют провоспалительные функции, высвобождая уникальный спектр цитокинов, и обеспечивают защиту организма от патогенов. Показано, что IL-17A, секретируемый Th17, индуцирует выработку других цитокинов и хемокинов, способствует экспансии и рекрутированию в очаг воспаления клеток врожденного иммунитета и, в кооперации с IL-1 β и TNF- α , усиливает воспалительные реакции в легких [Perreau M. et al., 2013; Wang G.Q. et al., 2014]. Другой Th17-ассоциированный цитокин – IL-22 – поддерживает тканевые реакции врожденного иммунитета, стимулирует секрецию интерферона (IFN) γ и антимикробных пептидов [Dhiman R. et al., 2014; Nikoорour E. et al., 2014]. В то же время ряд авторов склоняются к мнению, что Th17-цитокينات являются не столько провоспалительными, сколько выступают в роли модуляторов иммунного (в том числе противоинфекционного) ответа [Кологривова И.В. и соавт., 2011], что особенно актуально ввиду различий в иммунопатогенезе различных клинических форм ТЛ. Предполагается в частности, что при инфильтративном ТЛ, для которого характерна дисрегуляция Th1-зависимых иммунных реакций, увеличение числа и цитокинсекреторной активности Th17-лимфоцитов может быть направлено на возмещение функциональной недостаточности Th1-клеток. При диссеминированном ТЛ, при котором иммунный ответ поляризуется в направлении Th2-пути, Th17-лимфоциты могут обуславливать увеличение числа нейтрофилов в крови (важный фактор в период бактериемии) и подавлять секрецию цитокинов (в том числе IL-4), осуществляющих поддержание Th2-зависимых реакций и негативную регуляцию Th1-иммунного ответа [Есимова И.Е. и соавт., 2012; Чурина Е.Г. и соавт., 2013].

Цель исследования: охарактеризовать цитокинсекреторную активность и факторы цитокин-зависимой активации Th17-лимфоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания.

Задачи исследования:

1. Проанализировать взаимосвязь изменений количества CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ Th17-лимфоцитов в крови и секреции *in vitro* Th17-ассоциированных

цитокинов (IL-17A и IL-22) у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких с лекарственной чувствительностью и лекарственной устойчивостью возбудителя.

2. Оценить секрецию *in vitro* патогенетически значимых цитокинов, активирующих дифференцировку и функции Th17-лимфоцитов: IL-1 β , IL-6, TGF- β (моноклеарными лейкоцитами) и IL-23 (дендритными клетками) у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких с лекарственной чувствительностью и лекарственной устойчивостью возбудителя.

3. Охарактеризовать общие закономерности и особенности изменений функциональной активности Th17-лимфоцитов и секреции *in vitro* Th17-активирующих цитокинов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания.

Научная новизна исследования. Впервые проведена оценка количества и IL-17A- и IL-22-секреторной активности Th17-лимфоцитов крови в комплексе с показателями секреции *in vitro* модулирующих их цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-23, TGF- β) у больных ТЛ в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания – при инфильтративном и диссеминированном ТЛ с чувствительностью и устойчивостью *M. tuberculosis* к лекарственным средствам этиотропной терапии. Показано увеличение (сравнительно с нормой) содержания CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ клеток в крови при инфильтративном ТЛ (вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя) и диссеминированном лекарственно-чувствительном (ЛЧ) ТЛ, что в сочетании с гиперсекрецией *in vitro* IL-17A (с наибольшей выраженностью при диссеминированном лекарственно-устойчивом (ЛУ) ТЛ) и IL-22 свидетельствует об активации Th17-лимфоцитов. Вместе с тем отсутствие IL-17A- и IL-22-секреторной реакции моноклеарных лейкоцитов *in vitro* на стимуляцию вакцинным штаммом BCG указывает на снижение функционального резерва Th17-клеток. Установлено, что у больных ТЛ независимо от клинической формы и лекарственной чувствительности возбудителя секреция *in vitro* моноклеарными лейкоцитами крови IL-1 β (стимулирует дифференцировку Th17) и дендритными клетками IL-23 (поддерживает функциональную активность зрелых Th17) сохраняется в пределах нормы и не проявляет модулирующего влияния (ввиду отсутствия взаимосвязей) на функциональное состояние Th17-лимфоцитов. Увеличение количества и цитокинсекреторной активности Th17-лимфоцитов у больных ТЛ соотносится с гиперсекрецией IL-6 и (при инфильтративном ЛУТЛ) гипосекрецией TGF- β *in vitro*. В случае гиперсекреции TGF- β и отсутствии отклонений со стороны секреции IL-6 *in vitro* количество CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ лимфоцитов в крови у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ сохраняется в пределах нормы.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные могут служить основой для разработки новых патогенетически обоснованных иммунотерапевтических подходов к направленной коррекции иммунодефицитных состояний при туберкулезе легких посредством активирующего воздействия на дифференцировку и функции Th17-лимфоцитов.

Результаты настоящего исследования используются в учебном процессе на кафедрах патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии, иммунологии и

аллергологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России для студентов лечебного, педиатрического, фармацевтического и медико-биологического факультетов.

Методология и методы исследования. Для реализации поставленных задач выбраны современные высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе научно-исследовательских лабораторий ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. В качестве материала исследования использовали венозную кровь, взятую утром натощак из локтевой вены. Основные методы исследования:

1. Выделение, культивирование и стимуляция мононуклеарных лейкоцитов с использованием вакцинного штамма BCG;
2. Выделение, культивирование и трансформация *in vitro* моноцитов периферической крови в дендритные клетки с использованием стимуляторов их созревания;
3. Иммуноферментный анализ секреции *in vitro* цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови (IL-17A, IL-22, IL-1 β , IL-6, TGF- β) и дендритными клетками (IL-23);
4. Иммунофенотипирование Th17 с определением экспрессии поверхностных рецепторных молекул CD4, CD161 и внутриклеточного маркера IL-17A методом проточной цитофлуориметрии;
5. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. У больных инфильтративным и лекарственно-чувствительным диссеминированным туберкулезом легких увеличение относительного и абсолютного содержания CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ Th17-лимфоцитов в крови соотносится с повышением секреции *in vitro* Th17-ассоциированных цитокинов IL-17A и IL-22 при снижении цитокинсекреторного резерва клеток.
2. Увеличение количества и цитокинсекреторной активности Th17-лимфоцитов у больных туберкулезом легких взаимосвязано с гиперсекрецией IL-6 и (при инфильтративной форме заболевания с лекарственной устойчивостью возбудителя) гипосекрецией TGF- β и не зависит от секреции IL-1 β и IL-23 *in vitro*.
3. Течение лекарственно-устойчивого туберкулеза легких сопровождается наиболее выраженным повышением количества Th17-лимфоцитов в крови (при инфильтративной форме) и секреции *in vitro* IL-17A (при диссеминированной форме).

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

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XVIII Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2012); XIX Межгородской конференции

молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2013), Пятой Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2013); 77-й Итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора П.Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б.М. Зельмановича (Красноярск, 2013); 80-й Юбилейной Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2013); III Межрегиональной конференции молодых ученых, посвященной Дню российской науки (Новосибирск, 2015); III Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2015); на научно-образовательных семинарах Сибирского центра компетенции по проблеме инфекционных заболеваний им. И.И. Мечникова и Р. Коха (Томск, 2011-2013), на научных семинарах кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2011-2013).

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7).

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 полнотекстовых статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 7 тезисов в сборниках научных трудов и материалов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 8 таблицами. Библиографический список включает 277 источников, из них 47 отечественных и 230 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, а именно, описано участие различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе на *M. tuberculosis*, в том числе возможный вклад Th17-лимфоцитов в его реализацию. Охарактеризованы фенотипические особенности, механизмы цитокин-зависимой активации и дифференцировки Th17, а также секреторная активность клеток.

Другая часть главы посвящена описанию основных функций ключевых Th17-ассоциированных цитокинов – IL-17A и IL-22 и их роли в иммунопатогенезе туберкулеза легких.

Во второй главе диссертации описаны материал и методы исследования. В ходе выполнения работы было обследовано 117 пациентов (92 мужчины и 25 женщин) в возрасте от 20 до 55 лет (средний возраст – $39,9 \pm 9,1$ года) с впервые выявленным распространенным деструктивным инфильтративным (66 (56,41%) человек) и диссеминированным (51 (43,59%) человек) туберкулезом легких (ТЛ). Помимо клинической формы ТЛ при проведении исследований учитывалась чувствительность возбудителя к противотуберкулезным средствам. Всего были обследованы 78 (66,67%) пациентов с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и 39 (33,33%) пациентов с лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ). Все обследованные больные ТЛ находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице (в н.в. – ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр»). Диагноз ТЛ устанавливался на основании анамнеза больного, клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты.

Все исследования проводились однократно до проведения пациентам специфической противотуберкулезной химиотерапии. Критериями исключения больных ТЛ из исследования служили: возраст менее 20 или более 55 лет; проведение вакцинации/ревакцинации BCG (*Bacillus Calmette–Guerin*) и другими вакцинами в течение 3-х лет, предшествующих исследованию; инфицирование вирусами гепатита и ВИЧ; менее 3-х месяцев назад перенесенная инфекция; острые и хронические (в стадии обострения) сопутствующие инфекционные и соматические заболевания; аллергические и аутоиммунные заболевания; получение терапии иммуномодулирующими препаратами и глюкокортикоидами; у женщин исключалась беременность; отказ от исследования.

В контрольную группу вошло 50 добровольцев с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Экспериментальные исследования выполнялись в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии при кафедре патофизиологии, Научно-образовательном центре «Клиническая и экспериментальная иммуногенетика», Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови и моноцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом градиентного центрифугирования. Клеточность полученных суспензий определяли в камере Горяева, жизнеспособность выделенных клеток оценивали по данным теста с трипановым синим. Для исследования использовали суспензии, жизнеспособность клеток в которых была не менее 95%.

Стимуляцию цитокинсекреторной активности мононуклеарных лейкоцитов

осуществляли внесением в пробы вакцинного штамма BCG (ФГУП «НПО Микроген», Россия) в дозе 50 мкг/мл. Для трансформации моноцитов периферической крови в дендритные клетки в качестве стимуляторов использовали IL-4 и GM-CSF («Sigma», USA) в концентрации 20 нг/мл, а также липополисахарид («Sigma», USA) в концентрации 5 мг/мл.

Для измерения концентрации IL-17A, IL-22, IL-1 β , IL-6, TGF- β и IL-23 в супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; «R&D Systems», США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия). Результаты представляли в пг/мл.

Для подсчета клеток (в % и $\times 10^9$ /л) с экспрессией поверхностных молекул CD4, CD161 и внутриклеточным содержанием IL-17A использовали метод проточной лазерной трехцветной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр «FACS Calibur Flow cytometer BD», «Becton Dickinson», США) и моноклональные антитела (МКАТ), меченные флуоресцентными метками (PerCP к CD4, FITC к CD161, PE к IL-17A) согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем («Becton Dickinson», США). В исследовании применяли изотипический контроль МКАТ (мышиный IgG1), меченных PerCP, FITC и PE («Becton Dickinson», США).

Статистический анализ полученных результатов исследования проводили на основе общепринятых методов с использованием пакета программ «Statistica for Windows» (Version 10.0) фирмы «Stat SoftInc.» и «Microsoft Excel» (2010) корпорации «Microsoft». Гипотезу о нормальном законе распределения количественных показателей проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Результаты представляли в виде медианы (50%, Me), нижнего (25%, Q1) и верхнего (75%, Q3) квартилей. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический T-критерий Вилкоксона для зависимых выборок и непараметрический U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Различия двух сравниваемых величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. С целью выявления функциональных взаимосвязей между группами изучаемых параметров вычисляли коэффициент корреляции Спирмена (ненормальное распределение) [Флейс Дж., 1989; Бронштейн И.Н., Семендяев К.А., 2009].

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

Четвертая глава диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной литературе.

Th17-субпопуляция CD4⁺-лимфоцитов привлекает большое внимание

исследователей в связи с участием в развитии протективного иммунного ответа против внутриклеточных патогенов, в том числе и *M. tuberculosis* [Perreau M. et al., 2013; Wang G.Q. et al., 2014]. Учитывая важность Th1-ответа в противотуберкулезном иммунитете, а также потенциальные возможности вклада Th17-лимфоцитов в его реализацию, совместная индукция Th1- и Th17-субпопуляций лимфоцитов представляется оптимальной для защиты человека против туберкулезной инфекции.

В ходе проведенного исследования у пациентов с ТЛ зарегистрировано увеличение числа $CD4^+CD161^+IL-17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови по сравнению с группой здоровых доноров. Исключение составили пациенты с диссеминированным ЛУТЛ, у которых содержание данных клеток в крови оставалось в пределах нормы (таблица 1).

Таблица 1 – Количество $CD4^+CD161^+IL-17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Ме ($Q_1 - Q_3$)

Группы обследованных лиц	$CD4^+CD161^+IL17A^+$ Th17-лимфоциты
	(в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9/л$)
Здоровые доноры	1,41 (0,79–2,72)
	0,032 (0,013–0,056)
Больные инфильтративным ЛЧТЛ	3,00 (1,80–4,34) $p_1=0,014$
	0,054 (0,032–0,087) $p_1=0,026$
Больные инфильтративным ЛУТЛ	5,60 (2,38–10,49) $p_1<0,001; p_4=0,003$
	0,123 (0,051–0,409) $p_1<0,001; p_4=0,005$
Больные диссеминированным ЛЧТЛ	3,07 (2,75–5,06) $p_1=0,008$
	0,061 (0,039–0,088) $p_1=0,015$
Больные диссеминированным ЛУТЛ	1,43 (0,68–2,39) $p_2=0,002; p_4=0,046$
	0,028 (0,009–0,037) $p_2 < 0,001$

Примечание – здесь и в таблицах 2, 3, 4: 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_4 – у больных с ЛЧТЛ.

Большая часть исследователей склоняется к мнению, что при инфекциях, вызванных *M. tuberculosis*, иммунный ответ, опосредованный Th17-

лимфоцитами, является важным механизмом защиты бронхоальвеолярного тракта и поддержания его барьерных свойств. Известно, что Th17-лимфоциты выполняют иммунорегуляторную функцию посредством синтеза и секреции цитокинов, главным образом, IL-17 (у человека преимущественно IL-17A) и IL-22, а также IL-21, IL-26, интерферона (IFN) γ и хемокина CCL-20 (*C-C motif Ligand 20*) [Sutton C.E. et al., 2009].

Анализ цитокинсекреторной активности мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* показал, что течение ТЛ сопровождается увеличением базальной секреции ключевых Th17-цитокинов – IL-17A и IL-22. Важно отметить, что уровень секреции IL-17A в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ оказался в 10,2 и 7,8 раза выше, чем у здоровых доноров и больных с инфильтративным ЛУТЛ соответственно (таблица 2).

Таблица 2 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Ме (Q₁ – Q₃)

Группы обследованных лиц		Концентрация IL-17A, пг/мл		Концентрация IL-22, пг/мл	
		Базальная секреция	При инкубации с вакцинным штаммом BCG	Базальная секреция	При инкубации с вакцинным штаммом BCG
Здоровые доноры		20,41 (18,97-22,89)	27,11 (25,30-30,14) $p_3=0,01$	14,48 (10,09-33,68)	60,77 (41,75-73,58) $p_3=0,04$
Больные инфильтративным туберкулезом легких	ЛЧТЛ	37,64 (25,89-221,55) $p_1<0,001$	36,34 (32,81-323,89) $p_1=0,027$	35,76 (20,12-50,38) $p_1=0,045$	97,19 (76,57-133,76) $p_1=0,02$ $p_3=0,044$
	ЛУТЛ	26,68 (22,81-32,48) $p_1=0,015$	32,93 (21,91-34,07)	39,87 (27,79-68,36) $p_1=0,037$	44,74 (26,89-62,43)
Больные диссеминированным туберкулезом легких	ЛЧТЛ	63,48 (46,40-101,81) $p_1<0,001$	57,08 (40,24-69,03) $p_1=0,009$	34,78 (20,01-45,76) $p_1=0,049$	20,29 (14,82-51,34) $p_1<0,001$ $p_2=0,007$
	ЛУТЛ	209,08 (58,78-323,83) $p_1=0,001$ $p_2=0,003$	292,84 (88,37-321,61) $p_1<0,001$ $p_2=0,003$	42,94 (36,40-66,53) $p_1=0,032$	47,71 (46,69-66,96)

Примечание – здесь и в таблице 3: p_3 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями базальной секреции.

Увеличение численности CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ Th17-лимфоцитов в крови у больных ТЛ и характеризующее активацию данного типа клеток повышение базальной секреции IL-17A и IL-22 *in vitro*, учитывая свойства указанных

цитокинов, может быть направлено на привлечение в очаг воспаления клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов и макрофагов), а также на стимуляцию Th1-лимфоцитов – клеток адаптивного противотуберкулезного иммунитета. Действуя совместно, указанные клетки отграничивают зону повреждения в легких от ткани, не вовлеченной в патологический процесс, способствуют гибели и элиминации *M. tuberculosis* [Shah K. et al., 2010; Du J. et al., 2015].

Известно, что одним из показателей результативности иммунного ответа является реакция клеток на стимуляцию антигеном. Поскольку вакцинный штамм BCG является специфическим стимулом в отношении пула антиген-реактивных клеток, формирующегося при ТЛ, данная вакцина была использована для оценки резерва цитокинсекреторной функции лимфоцитов крови.

Добавление в культуры клеток вакцинного штамма BCG сопровождалось увеличением секреции IL-17A и IL-22 *in vitro* в сравнении с уровнем их базальной секреции лишь в группе здоровых доноров, а также у больных инфильтративным ЛЧТЛ, тогда как в других группах пациентов с ТЛ ответного повышения секреции указанных цитокинов на действие BCG не обнаруживалось, что свидетельствует об истощении функционального резерва Th17-лимфоцитов при ТЛ (таблица 2). При этом у больных диссеминированным ТЛ и инфильтративным ЛЧТЛ BCG-индуцированная секреция IL-17A мононуклеарными лейкоцитами периферической крови оказалась выше, чем у здоровых доноров. Увеличение BCG-индуцированной секреции IL-22 по сравнению с ее уровнем в группе здоровых добровольцев отмечалось лишь у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ, в то время как при диссеминированном ЛЧТЛ она была существенно ниже нормы (таблица 2).

Заслуживающим внимания результатом настоящего исследования оказался факт наиболее значимого повышения секреции IL-17A *in vitro* в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ, тогда как численность CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ клеток в этой группе больных оставалась в пределах нормы (таблицы 1, 2). Это позволяет полагать, что гиперсекреция анализируемого цитокина может быть связана с резким усилением цитокинсекреторной активности Th17-клеток при данном клинико-патогенетическом варианте ТЛ и/или (чего нельзя исключать) с повышением IL-17A-продуцирующей активности других мононуклеарных лейкоцитов, предположительно, $\gamma\delta$ T-клеток [Чурина Е.Г. и соавт., 2011, 2014; Andersson A. et al., 2015; Reinhardt A. et al., 2016].

Увеличение функциональной активности Th17-лимфоцитов при ТЛ подтверждалось выявленными в настоящем исследовании положительными взаимосвязями содержания CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ Th17-клеток и секреции IL-17A ($r=0,56$, $p<0,05$) и IL-22 ($r=0,50$, $p<0,05$).

Принимая во внимание свойства секретируемых Th17-лимфоцитами IL-17A и IL-22, обладающих хемоаттрактантными и иммуномодулирующими свойствами, можно думать, что они в некоторой степени могут компенсировать эти и другие функции цитокинов, секретируемых фагоцитами [Khader S.A., Gopal R., 2010; Li L. et al., 2011]. В ряде научных работ IL-17A охарактеризован как цитокин-индуцирующий медиатор, проявляющий провоспалительные и гемопоетические функции за счет способности к стимуляции синтеза и

высвобождения других цитокинов и хемокинов (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α), демонстрируя свои физиологические эффекты на различных типах клеток [Guo H., Topham D.J., 2010; Jin W., Dong C., 2013].

В подтверждение возможности компенсации недостаточности реакций клеточного иммунного ответа Th17-лимфоцитами и секретлируемыми ими цитокинами можно привести ряд фактов. В первую очередь, Th17-клетки могут преобразовываться в Th1 или T-регуляторные клетки – Treg (и наоборот), т.е. обладают свойством «пластичности». Такое преобразование возможно за счет прекращения экспрессии ключевого фактора транскрипции Th17 – RORC2, и, напротив, усиления экспрессии факторов T-bet (для Th1) или Foxp3 (для Treg). Кроме того, функциональная пластичность Th17-лимфоцитов проявляется способностью к экспрессии цитокинов других клеточных субпопуляций, например, при их трансформации в IL-17A⁺IFN- γ ⁺ Th1/Th17-клетки. В данном случае Th17 не преобразуются в другую субпопуляцию клеток (в Th1), но становятся способными поддерживать важнейшую их функцию – секретировать IFN- γ . Вместе с тем, несмотря на то, что Th1 могут подавлять генерацию Th17 с помощью ингибирующих сигналов от IFN- γ [Guo H., Topham D.J., 2010], IL-17A, в свою очередь, может выступать в качестве позитивного регулятора дифференцировки Th1 при ряде внутриклеточных инфекций, таких как хламидийная, туберкулезная и др. [Iyoda M. et al., 2010; Reinhardt A. et al., 2016]. Показано, что IL-17A индуцирует образование IL-12 дендритными клетками, а также продукцию IL-12 и IFN- γ макрофагами, опосредуя тем самым формирование IL-12-зависимого Th1-ответа, а также стимуляцию врожденного иммунитета [Li L. et al., 2010]. Кроме того, имеются данные, что IL-17A оказывает содействие хемоаттрактантам в стимуляции адгезии лейкоцитов (моноцитов, эозинофилов, T-клеток) путем влияния на продукцию CCL5 (*C-C motif ligand 5*) [Acosta-Rodriguez E.V. et al., 2007].

Поскольку образование, созревание и цитокинсекреторная активность Th17-клеток – регулируемый процесс, было интересным оценить уровень секреции *in vitro* цитокинов, ответственных за дифференцировку и поддержание активности зрелых Th17-лимфоцитов – IL-1 β , IL-6, IL-23 и TGF- β .

IL-1 β , секретлируемый фагоцитами, играет важную роль в развитии, регуляции и исходе воспалительного процесса. К основным биологическим эффектам цитокина следует отнести индукцию «острофазной реакции», включающей лихорадку, лейкоцитоз, продукцию и секрецию белков острой фазы, экспрессию интегринов, хемотаксис и увеличение функциональной активности лейкоцитов [Zhang G. et al., 2014].

Как показали результаты проведенного исследования, секреция IL-1 β мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* (базальная и VCG-индуцированная) у больных ТЛ независимо от клинической формы и варианта заболевания оставалась в пределах контрольных значений (таблица 3). При этом статистически значимых корреляций между показателями, характеризующими секрецию IL-1 β и количество и/или цитокинсекреторную активность Th17-лимфоцитов, обнаружено не было.

Следует отметить, что экспрессия рецептора для IL-1 β (IL-1R1) на T-

лимфоцитах является IL-6-опосредованной [Zhang B. et al., 2013]. Активный синтез IL-6 начинается сразу после взаимодействия фагоцитов с *M. tuberculosis*. Спектр биологического действия IL-6 достаточно широк, но преимущественно заключается в стимуляции дифференцировки фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов [Schreiber H.A. et al., 2010; Rosser E.C. et al., 2014]. Известно, что функционально активные Th17-лимфоциты формируются из наивных CD4⁺ Т-клеток в ответ на стимуляцию IL-6, который, действуя через фактор транскрипции STAT3, повышает экспрессию другого фактора транскрипции – RORC2, в свою очередь усиливающего экспрессию генов Th17-ассоциированных цитокинов – IL-17A и IL-22 [Дьяченко П.А., Дьяченко А.Г., 2010].

Таблица 3 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-1 β , IL-6 и TGF- β мононуклеарными лейкоцитами крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Ме (Q₁-Q₃)

Группы обследованных лиц	Концентрация IL-1 β , пг/мл		Концентрация IL-6, пг/мл		Концентрация TGF- β , пг/мл		
	Базальная секреция	Секреция после индукции BCG	Базальная секреция	Секреция после индукции BCG	Базальная секреция	Секреция после индукции BCG	
Здоровые доноры	326,15 (305,20-357,10)	330,80 (319,30-361,80)	218,70 (143,80-281,10)	220,50 (142,20-266,50)	934,20 (746,60-1487,20)	1087,80 (764,10-1242,66)	
Больные инфильтративным ТЛ	ЛЧ	344,40 (330,40-362,00)	336,40 (322,70-355,50)	288,00 (278,40-332,00) p ₁ =0,023	275,10 (267,60-281,90) p ₁ =0,042	1059,00 (610,31-1167,54)	1167,30 (939,80-1361,70)
	ЛУ	330,40 (322,80-373,80)	340,10 (321,80-346,20)	279,50 (267,60-295,10) p ₁ =0,041	254,80 (223,50-269,30)	748,80 (315,29-986,70) p ₁ =0,046 p ₄ =0,044	621,72 (195,32-838,20) p ₁ =0,050 p ₄ =0,030
Больные диссеминированным ТЛ	ЛЧ	322,80 (318,50-428,10)	326,40 (318,90-349,80)	272,65 (233,95-297,15) p ₁ =0,031	273,70 (238,95-363,85)	1209,19 (935,81-1473,50)	783,21 (570,10-1100,06) p ₂ =0,039 p ₃ =0,012
	ЛУ	336,10 (319,40-362,00)	337,80 (322,60-344,70)	321,80 (222,30-403,70)	315,75 (281,90-366,00)	1733,20 (1071,57-2435,30) p ₁ =0,015 p ₂ =0,001	1823,70 (835,53-2825,20) p ₂ =0,013 p ₄ =0,028

Примечание – ТЛ – туберкулез легких; ЛЧ – лекарственно-чувствительный; ЛУ – лекарственно-устойчивый.

Уровень базальной секреции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови оказался повышенным в группе пациентов с инфильтративным ТЛ. VCG-стимулированная секреция IL-6 *in vitro* при инфильтративном ЛЧТЛ также оказалась выше контрольных значений (таблица 3). Кроме того, увеличение базальной секреции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови регистрировалось у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ (таблица 3).

Известно, что для диссеминированной формы ТЛ характерным является ареактивное состояние клеточного звена иммунитета с преобладанием Th2-опосредованных реакций [Чурина Е.Г. и соавт., 2013]. Активация иммунного ответа по типу Th2 при диссеминированном ТЛ связана, как упоминалось ранее, с фактором бактериемии. В тот момент, когда *M. tuberculosis* находятся вне фагоцитов, они становятся доступными для действия антител, образующихся в процессе реализации Th2-ответа. В свою очередь, за созревание и дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, синтезирующие антитела, отвечает IL-6, с чем, вероятно, и связан высокий уровень базальной секреции цитокина при диссеминированном ЛЧТЛ [Miller S.A., Weinmann A.S., 2010; Josefowicz S.Z. et al., 2012].

При анализе содержания в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов другого фактора созревания Th17-лимфоцитов – TGF- β – обращало на себя внимание то, что базальная секреция цитокина значительно повышалась при диссеминированном ЛУТЛ, тогда как у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ регистрировалось снижение как базальной, так и VCG-индуцированной секреции TGF- β *in vitro* по сравнению со здоровыми донорами и больными инфильтративным ЛЧТЛ (таблица 3).

Необходимо отметить, что среди эффектов TGF- β описаны как провоспалительные (фактор хемотаксиса лейкоцитов и синтеза ими провоспалительных цитокинов), так и противовоспалительные (супрессия пролиферации лимфоцитов, цитотоксичности Т-лимфоцитов и антимикробных защитных функций макрофагов) свойства, что напрямую зависит от его концентрации в среде. Известно, что в высоких концентрациях TGF- β является антагонистом воспалительных реакций (в том числе секреции TNF- α) в отношении подавления роста микобактерий. Не исключается, что дефицит продукции TGF- β альвеолярными макрофагами (ввиду хемотаксической его функции) обеспечивает ограничение потенциально повреждающего воспалительного ответа в легочной ткани [Чурина Е.Г. и соавт., 2013].

С другой стороны, имеются данные, что пролиферация и дифференцировка Th17-лимфоцитов, выполняющих в организме человека защитную функцию против *M. tuberculosis*, находятся в тесной взаимосвязи с другой субпопуляцией Т-клеток – Treg, участвующих в реализации иммуносупрессии и иммунологической толерантности, в том числе путем секреции TGF- β [Caramori G. et al., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2014; Chen X., Oppenheim J.J., 2014]. Согласно данным литературы, в низких дозах TGF- β индуцирует дифференцировку Th17-лимфоцитов, в то время как высокие концентрации цитокина способствуют формированию Treg. Считается, что ключевым фактором, благодаря которому TGF- β индуцирует созревание Т-клеток в Th17,

является одновременное присутствие в среде IL-6 [Кононова Т.Е. и соавт., 2015]. Поясняют данный факт исследования, демонстрирующие необходимость наличия в среде IL-6 и TGF- β для дифференцировки Th17-клеток у мышей, тогда как у человека – это IL-6 и IL-1 β без участия TGF- β [Gu C. et al., 2013; Турцевич И.З. и соавт., 2014]. E.V. Acosta-Rodrigues и соавторы (2007), изучая процесс дифференцировки Th17-лимфоцитов в образцах крови человека *in vitro*, выявили, что секретируемых активированными моноцитами/макрофагами и дендритными клетками IL-6 и IL-1 β достаточно для его реализации. Антитела, нейтрализующие эти цитокины, блокировали дифференцировку Th17-лимфоцитов [Acosta-Rodrigues E.V. et al., 2007].

Полученные в настоящем исследовании результаты по секреции TGF- β подтвердили концепцию, что в низких дозах TGF- β способствует дифференцировке Th17-лимфоцитов (наибольшее увеличение числа CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ клеток в условиях гипосекреции TGF- β при инфильтративном ЛУТЛ), в то время как высокие концентрации цитокина ее сдерживают (при повышении секреции TGF- β уровень CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ клеток при диссеминированном ЛУТЛ сохранялся в пределах контрольных значений), способствуя, по-видимому, формированию, в первую очередь, Treg.

Для реализации Th17-иммунного ответа важным фактором также является наличие в среде IL-23, который поддерживает функциональную активность зрелых Th17. IL-23, секретируемый дендритными клетками после их взаимодействия с *M. tuberculosis*, активирует Th17-лимфоциты и продукцию ими значительных количеств IL-17A и IL-22 [Waite J.C., 2012; Taherian M. et al., 2014].

Учитывая данное свойство IL-23, нами была проведена оценка секреции цитокина дендритными клетками *in vitro* у больных ТЛ и у здоровых доноров. Как показали результаты проведенного исследования, уровень секреции IL-23 у больных ТЛ сохранялся в пределах нормы (таблица 4).

По-видимому, при ТЛ имеет место дефект со стороны дендритных клеток, проявляющийся в отсутствии их IL-23-секреторной реакции в ответ на действие инфекционного возбудителя. Учитывая дефект индуктивной фазы иммунитета (на этапе активации дендритных клеток при связывании с *M. tuberculosis*), а также дефицит Th1-эффекторных лимфоцитов, можно заключить, что при ТЛ нарушения клеточно-опосредованного иммунитета отмечаются как на уровне врожденных, так и на уровне адаптивных Th1-зависимых реакций. В подобных условиях в организме человека, вероятно, должны активироваться иммунные механизмы, направленные на компенсацию функциональной недостаточности врожденного звена иммунитета и Th1-лимфоцитов. Так, например, показано, что течение ТЛ характеризуется повышением трансформационной активности моноцитов в дендритные клетки *in vitro* и, следовательно, увеличением их численности в крови у больных туберкулезом [Дитто З.К., 2013].

Таблица 4 – Концентрация ИЛ-23 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у здоровых доноров и больных туберкулезом легких, Ме (Q₁-Q₃)

Группы обследованных лиц	Концентрация ИЛ-23, пг/мл
Здоровые доноры	633,92 (261,58-1744,11)
В зависимости от клинической формы туберкулеза легких	
Инфильтративный туберкулез легких	1113,47 (592,86-1939,09)
Диссеминированный туберкулез легких	466,17 (237,21-645,44)
В зависимости от лекарственной чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Инфильтративный ЛЧТЛ	711,06 (495,50-1253,09)
Инфильтративный ЛУТЛ	1165,11 (1097,03-2282,11)
Диссеминированный ЛЧТЛ	261,75 (170,03-340,79)
Диссеминированный ЛУТЛ	496,07 (197,38-994,76)

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что течение ТЛ характеризуется повышением численности CD4⁺CD161⁺ИЛ-17А⁺ Th17-лимфоцитов в периферической крови в ассоциации с BCG-индуцированной и/или базальной гиперсекрецией *in vitro* ИЛ-17А и ИЛ-22 (исключение – снижение индуцированной секреции ИЛ-22 при диссеминированном ЛЧТЛ). Указанные изменения сочетаются с гиперсекрецией *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами крови ИЛ-6 (за исключением больных диссеминированным ЛУТЛ) при соответствующей норме секреции других цитокинов-активаторов Th17-клеток: ИЛ-1β (базальной и в случае BCG-индукции) и ИЛ-23.

Влияние ИЛ-6 на процессы дифференцировки и активации Th17-лимфоцитов подтверждается выявленной в настоящем исследовании положительной взаимосвязью между содержанием CD4⁺CD161⁺ИЛ-17А⁺ Th17-клеток в крови, концентрацией ИЛ-17А и ИЛ-22 *in vitro* и секрецией мононуклеарными лейкоцитами ИЛ-6 ($r=0,61$, $p<0,05$; $r=0,51$, $p<0,05$; $r=0,26$, $p<0,05$ соответственно).

Изменения секреции TGF-β при ТЛ носят разнонаправленный характер: увеличение при диссеминированном ЛУТЛ и снижение при инфильтративном ЛУТЛ. В данном случае о влиянии концентрации TGF-β в среде на созревание Th17-клеток при ТЛ (за исключением группы больных с диссеминированным ЛУТЛ) указывают обнаруженные отрицательные корреляции между количеством CD4⁺CD161⁺ИЛ-17А⁺ Th17-лимфоцитов в крови, секрецией мононуклеарными лейкоцитами ИЛ-17А и ИЛ-22 и концентрацией *in vitro* TGF-β ($r=-0,55$, $p<0,05$; $r=-0,39$, $p<0,05$; $r=-0,12$, $p<0,05$ соответственно).

В целом, установленное в настоящем исследовании увеличение численности CD4⁺CD161⁺ИЛ-17А⁺ Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ, а

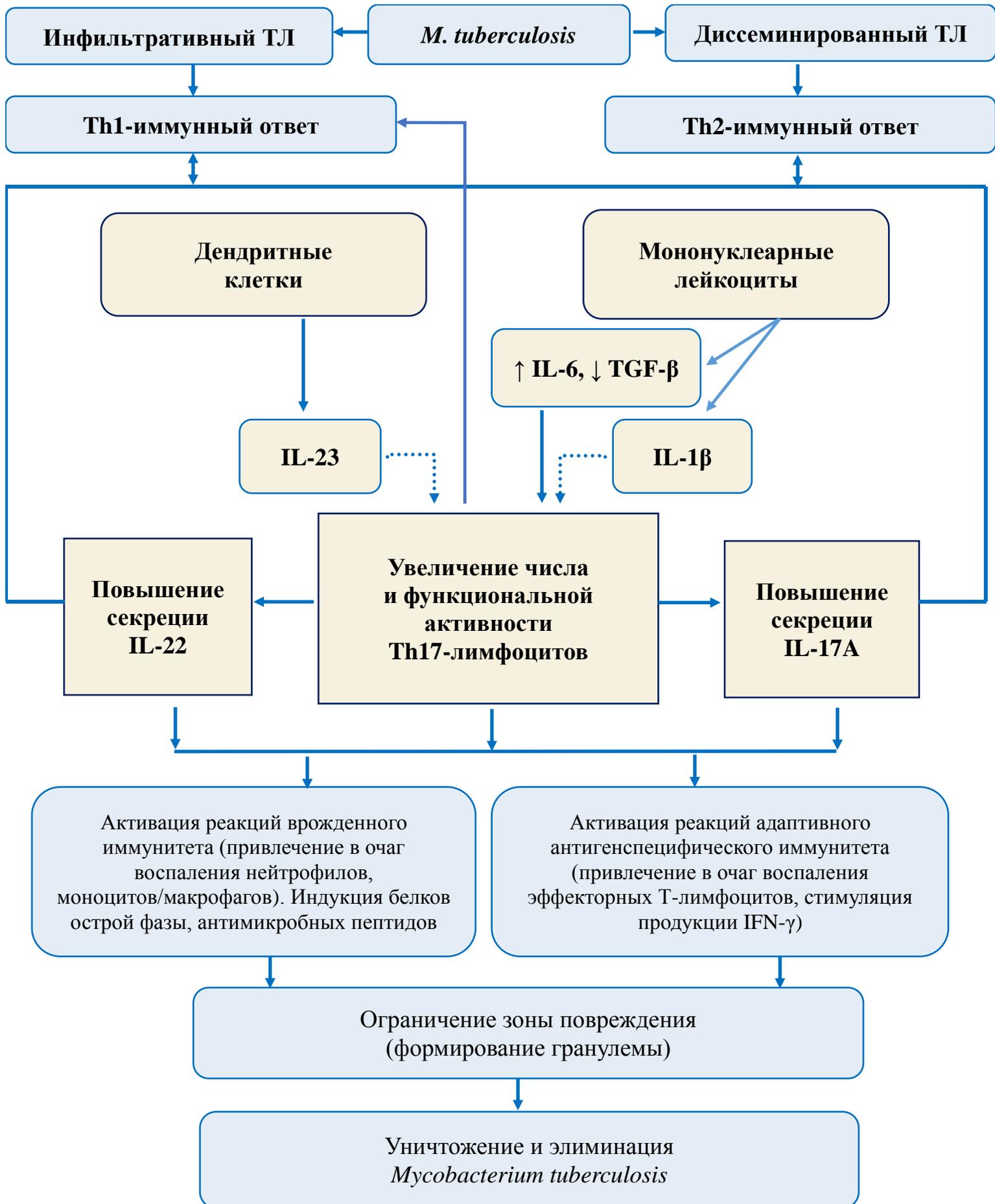


Рисунок 1 – Схема активации Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких по данным литературы (выделено голубым цветом) и результатам собственных исследований (выделено желтым цветом); прерывистая стрелка – эффект цитокина отсутствует.

также их IL-17A- и IL-22-секреторной активности, вероятно, может рассматриваться как иммунная реакция, направленная на компенсацию недостаточности факторов, в первую очередь, Th1-ответа (рисунок 1). Вместе с тем в условиях отсутствия выраженной активации секреции IL-1 β мононуклеарными лейкоцитами крови у больных ТЛ и сходства его биологической активности с Th17-цитокинами (хемотаксис гранулоцитов и фагоцитов, усиление продукции ими медиаторов воспаления и функциональной активности лимфоцитов), можно предположить, что Th17-клетки в некоторой степени могут компенсировать дефект и врожденного звена иммунитета.

В целом, опосредованные IL-17A привлечение иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления, формирование и поддержание структуры гранулемы, а также происходящие под влиянием IL-22 продукция антимикробных пептидов, регенерация поврежденных тканей легких и эрадикация *M. tuberculosis* способствуют усилению противотуберкулезной защиты организма и контролю над инфекцией.

Полученные результаты подчеркивают актуальность дальнейшего и более детального изучения новых молекулярных механизмов реагирования иммунной системы на инфицирование *M. tuberculosis*, в частности, через индукцию Th17-лимфоцитов с целью разработки современных методов патогенетически обоснованной иммунокоррекции нарушений, возникающих в условиях туберкулезной инфекции, и мониторинга эффективности проводимого лечения.

ВЫВОДЫ

1. Относительное и абсолютное содержание CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ Th17-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких повышается в разной степени в зависимости от клинико-патогенетического варианта заболевания, до наибольших значений – при инфильтративном лекарственно-устойчивом варианте болезни (5,6% от общего числа лимфоцитов или $0,123 \times 10^9$ /л).
2. Гиперсекреция *in vitro* Th17-ассоциированных цитокинов IL-17A и IL-22 при туберкулезе легких зависит от количества CD4⁺CD161⁺IL-17A⁺ клеток в крови и свидетельствует об активации Th17-лимфоцитов. Наиболее выраженное увеличение секреции IL-17A *in vitro* выявляется при диссеминированном туберкулезе легких с лекарственной устойчивостью возбудителя.
3. Отсутствие IL-17A- и IL-22-секреторной реакции *in vitro* на действие вакцинного штамма BCG указывает на снижение функционального резерва Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких.
4. Увеличение количества и цитокинсекреторной активности Th17-лимфоцитов у больных туберкулезом легких взаимосвязано с гиперсекрецией IL-6 и (у больных с инфильтративным лекарственно-устойчивым вариантом болезни) гипосекрецией TGF- β мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*.
5. При гиперсекреции TGF- β в отсутствие изменений секреции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* у больных диссеминированным лекарственно-устойчивым туберкулезом легких количество Th17-лимфоцитов

в крови сохраняется в пределах нормы.

6. Секретция *in vitro* IL-1 β (базальная и VCG-индуцированная) и IL-23 не связана с изменениями количества и функциональной активности Th17-лимфоцитов у больных туберкулезом легких вне зависимости от клинической его формы и лекарственной чувствительности возбудителя.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Особенности иммунных реакций у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, М.В. Игнатов // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 4. – С. 160–162.
2. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов, О.В. Филинюк, О.И. Новосельцева, Е.П. Степанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 1. – С. 39–45.
3. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток и секрета противовоспалительных цитокинов у больных туберкулезом легких / Т.Е. Кононова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, М.В. Игнатов // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XVIII межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2012. – С. 71–72.
4. Количество Т-лимфоцитов-хелперов типа 17 при туберкулезе легких / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Ю.В. Колобовникова, М.В. Игнатов, П.А. Захарова // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы пятой международной научно-практической конференции. – СПб., 2013. – С. 54–56.
5. Секреторная активность Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких / М.В. Игнатов, Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, М.С. Писаренко, П.А. Захарова // Актуальные проблемы патофизиологии: материалы XIX межгородской конференции молодых ученых. – СПб., 2013. – С. 51–52.
6. Секретция IL-17A лимфоцитами периферической крови при туберкулезе легких / В.С. Полетика, О.И. Уразова, Т.Е. Кононова, М.В. Игнатов, П.А. Захарова // Актуальные вопросы медицинской науки: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова. – Ярославль, 2013. – С. 81.
7. Секретция IL-17A и IL-22 лимфоцитами периферической крови при туберкулезе легких / В.С. Полетика, О.В. Печенова, М.В. Игнатов, П.А. Захарова // Материалы 77-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора П.Г. Макарова и 90-летию со дня рождения доцента Б.М. Зельмановича. – Красноярск, 2013. – С. 733–734.
8. Функциональная активность Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, Ю.В.

Колобовникова, М.В. Игнатов, П.А. Захарова, О.В. Печенова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 12. – С. 701–704.

9. IL-22-секреторная активность лимфоцитов периферической крови при туберкулезе легких / В.С. Полетика, М.В. Игнатов, П.А. Захарова, О.В. Печенова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 80-й юбилейной Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск, 2013. – С. 97–98.
10. Игнатов М.В. Фенотипические особенности и секреторная активность Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких / М.В. Игнатов // Современные тенденции развития науки и технологий: материалы III Международной научно-практической конференции. – Белгород, 2015. – Часть II. – С. 106–108.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ЛУ	–	лекарственно-устойчивый
ЛЧ	–	лекарственно-чувствительный
ТЛ	–	туберкулез легких
BCG	–	<i>Bacillus Calmette–Guerin</i> – бацилла Кальметта-Герена
GM-CSF	–	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IFN	–	<i>Interferon</i> – интерферон
IL	–	<i>Interleukin</i> – интерлейкин
TGF	–	<i>Transformed Grows Factor</i> – трансформирующий фактор роста
Th	–	<i>T-helper</i> – Т-хелпер
TNF	–	<i>Tumor Necrosis Factor</i> – фактор некроза опухоли
Treg	–	<i>Regulatory T-lymphocyte</i> – Т-регуляторный лимфоцит