

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

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

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

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

ТОМСК-2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Современные представления о вкладе различных клеточных субпопуляций в иммунный ответ на <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
1.2 Общая характеристика и секреторная активность Th17-лимфоцитов	20
1.2.1 Фенотипические особенности Th17-лимфоцитов	20
1.2.2 Механизмы цитокин-зависимой активации и дифференцировки Th17-лимфоцитов	23
1.2.3 Th17-цитокины: строение, рецепторы, биологическая активность	27
1.3 Роль Th17-ассоциированных цитокинов в иммунопатогенезе туберкулеза легких	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	43
2.1 Объект исследования	43
2.2 Материал исследования	46
2.3 Методы исследования	46
2.3.1 Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови	46
2.3.2 Подсчет количества лимфоцитов в клеточной суспензии и определение их жизнеспособности	47
2.3.3 Выделение моноцитов из взвеси мононуклеарных лейкоцитов	48
2.3.4 Стимуляция мононуклеарных лейкоцитов периферической крови	48
2.3.5 Трансформация моноцитов периферической крови в дендритные клетки	49
2.3.6 Анализ цитокинсекреторной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови и трансформированных дендритных клеток <i>in vitro</i>	49
2.3.7 Определение иммунофенотипа Th17-лимфоцитов крови	50
2.4 Статистический анализ результатов	53

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	55
3.1 Содержание CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких	55
3.1.1 Содержание CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	55
3.1.2 Содержание CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i> к противотуберкулезным средствам	56
3.2 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких	57
3.2.1 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	57
3.2.2 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i> к противотуберкулезным средствам	58
3.3 Секреция IL-1β, IL-6 и TGF-β мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких	61
3.3.1 Секреция IL-1β, IL-6 и TGF-β мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания	61
3.3.2 Секреция IL-1β, IL-6 и TGF-β мононуклеарными лейкоцитами крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности <i>Mycobacterium tuberculosis</i> к противотуберкулезным средствам	63
3.4 Секреция IL-23 дендритными клетками <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких	65
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	68

ВЫВОДЫ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ДК – дендритная клетка

ИКК – иммунокомпетентная клетка крови

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛПС – липополисахарид

ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких

ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких

МКАТ – моноклональные антитела

ПТС – противотуберкулезное средство

ТЛ – туберкулез легких

ЦОГ – циклооксигеназа

AHR – *Aryl Hydrocarbon Receptor* – Арил-гидрокарбоновый рецептор

AP-1 – *Activator Protein 1* – активирующий протеин 1

BCG – *Bacillus Calmette-Guerin* – бацилла Кальметта-Герена

Bcl-6 – *B-cell Lymphoma 6 Protein* – белок В-клеточной лимфомы 6

CD – *Cluster of Differentiation* – кластер дифференцировки

CXCR5 – *C-X-C Chemokine Receptor Type 5* – C-X-C хемокиновый рецептор типа 5

ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinase* – киназа, регулирующая внеклеточный сигнал

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* – флуоресцеина изотиоционат

GATA-3 – *Trans-Acting T-Cell-Specific Transcription Factor 3* – специфический транскрипционный фактор активации Т-лимфоцитов 3

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule-1* – молекула клеточной адгезии-1

ICOS – *Inducible COStimulator* – индуцибельный костимулятор

IFN – *Interferon* – интерферон

Ig – *Immunoglobulin* – иммуноглобулин

IL – *Interleukin* – интерлейкин

JAK – *Janus Kinase* – тирозинкиназа семейства Janus

LFA-1 – *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1* – антиген, ассоциированный с функцией лимфоцитов-1

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase* – митоген-ассоциированная протеинкиназа

MHC – *Major Histocompatibility Complex* – главный комплекс гистосовместимости

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

NK – *Natural Killer* – натуральный киллер

PD-1 – *Programmed Cell Death 1* – белок программируемой клеточной гибели-1

PE – *Phycoerythrin* – фикоэритрин

PerCP – *Peridinin-Chlorophyll Protein* – перидинин-хлорофилл протеин

PILAR – *Proliferation-Induced Lymphocyte-Associated Receptor* – лимфоцит-ассоциированный рецептор, индуцирующий пролиферацию

SOCS – *Suppressor of Cytokine Signaling* – супрессор цитокиновой сигнализации

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription* – трансдуктор сигнала и активатор транскрипции

TAK – *Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase* – киназа, активирующая трансформирующий фактор роста бетта

TCR – *T Cell Receptor* – Т-клеточный рецептор

TGF – *Transformed Grows Factor* – трансформирующий фактор роста

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor* – фактор некроза опухоли альфа

Th – *T-Helper* – Т-хелпер

T-bet – *T-Box Expressed in T Cells* – транскрипционный фактор семейства T-box, экспрессирующийся в Т-клетках

TRAF – *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor* – фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей

Treg – *Regulatory T Lymphocyte* – Т-регуляторный лимфоцит

TYK – *Tyrosine Kinase* – тирозинкиназа

## ВВЕДЕНИЕ

**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 [69, 95, 183, 226, 227]. Однако в формировании эффективной противотуберкулезной защиты следует учитывать и другие субпопуляции лимфоцитов, которые могут являться активными участниками воспалительной реакции, формирующейся в легких [209, 258, 259].

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 [8, 20, 47, 253].

Известно, что Th17 являются важными клетками в защите организма человека от некоторых микробов, таких как внеклеточные бактерии и грибы. В последнее время они стали рассматриваться также как главные посредники в патогенезе ряда воспалительных, в том числе аутоиммунных процессов. Вместе с тем имеются основания утверждать, что Th17 обладают протективным действием против внутриклеточных патогенов [83, 175, 227, 245], в том числе *Mycobacterium tuberculosis* [61, 110, 160]. Установлено, что Th17 вырабатывают значительные

количества провоспалительных цитокинов – IL-17, IL-22, IL-26 и фактор некроза опухоли (TNF)  $\alpha$ , а их дифференцировка и активность во многом зависят от концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6 и трансформирующего фактора роста (TGF)  $\beta$ , секретируемых мононуклеарными лейкоцитами крови, а также от содержания IL-23, являющегося продуктом дендритных клеток [5, 148, 159, 257]. 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 [5].

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.** 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 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ,



усиливает воспалительные реакции в легких [5, 17, 178, 245]. Другой Th17-ассоциированный цитокин – IL-22 – поддерживает тканевые реакции врожденного иммунитета, стимулирует секрецию интерферона (IFN)  $\gamma$  и антимикробных пептидов [136, 169]. В то же время ряд авторов склоняются к мнению, что Th17-цитокины являются не столько провоспалительными, сколько выступают в роли модуляторов иммунного (в том числе противoinфекционного) ответа [20], 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 [3, 20, 24, 28].

**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 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  (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 $\beta$ , IL-6, IL-23, TGF- $\beta$ ) 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<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> 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 мононуклеарных 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* мононуклеарными лейкоцитами крови IL-1 $\beta$  (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- $\beta$  *in*

*vitro*. В случае гиперсекреции TGF- $\beta$  и отсутствии отклонений со стороны секреции IL-6 *in vitro* количество CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> 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 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ ) 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- $\beta$  и не зависит от секреции IL-1 $\beta$  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).

**Публикации.** 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Современные представления о вкладе различных клеточных субпопуляций в иммунный ответ на *Mycobacterium tuberculosis*

В течение последних лет значительно расширились знания об иммунопатогенезе туберкулеза легких (ТЛ), однако представления о ключевом вкладе антигенпрезентирующих клеток (АПК) и Т-хелперов (Th) в иммунный ответ на *Mycobacterium tuberculosis* по-прежнему являются фундаментальными [13, 41, 69, 78, 189, 195, 235].

Особое место в противотуберкулезном иммунитете занимают АПК, представленные, в первую очередь, макрофагами и дендритными клетками, поскольку именно они обеспечивают первичное распознавание возбудителя инфекции, его связывание и презентацию антигена наивным Т-клеткам [42, 43]. После формирования «иммунного синапса» с АПК, наивные Т-клетки подвергаются активации, пролиферации и дифференцировке с формированием клона антигенспецифических Т-лимфоцитов [50, 185]. При этом дендритные клетки способны активировать лимфоциты в 10-100 раз сильнее, что определяет их превосходство над другими АПК [236]. В ходе борьбы организма с инфекцией, зрелые макрофаги и дендритные клетки секретируют провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин (IL) 1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27, фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и другие, тем самым поддерживая воспаление и стимулируя иммунный ответ в целом [75, 182, 221, 263].

Несмотря на важность АПК, необходимость Т-лимфоцитарного звена для реализации эффективного иммунного ответа на *M. tuberculosis* является неоспоримой. Т-хелперы – отдельный вид Т-лимфоцитов, главной функцией которых является усиление иммунного ответа за счет активации Т- и В-лимфоцитов, моноцитов и натуральных киллеров (NK). Основным фенотипическим признаком Th-лимфоцитов служит наличие на поверхности данных клеток молекулы CD4. Другой общей чертой Т-хелперной популяции является их способность распознавать чужеродные антигены на поверхности АПК

в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (*Major Histocompatibility Complex*, МНС) при помощи Т-клеточного рецептора (*T Cell Receptor*, TCR) [37, 47].

Еще совсем недавно Т-лимфоциты подразделялись на типы в зависимости от спектра продуцируемых ими цитокинов. Однако данный критерий оказался недостаточно удобным, и в последнее время было предложено классифицировать Т-лимфоциты по наличию специфических транскрипционных факторов, так как каждой популяции Т-лимфоцитов соответствует свой набор индивидуальных транскрипционных факторов и способ передачи сигнала [8, 45]. Согласно данной классификации, выделяют следующие подтипы CD4-позитивных клеток: Т-хелперы 0, или «наивные» недифференцированные Т-хелперы (Th0), Т-хелперы типа 1 (Th1), Т-хелперы типа 2 (Th2), фолликулярные Т-хелперы гуморального иммунного ответа (Tfh), регуляторные Т-лимфоциты (Treg), Th9- и Th22-клетки, а также Т-хелперы типа 17 (Th17) [17, 36, 47, 205, 249, 257, 265].

Известно, что Th0 – это CD4-позитивные Т-лимфоциты, присутствующие на ранних стадиях иммунного ответа. Основным свойством данной субпопуляции лимфоцитов считается продукция IL-2 – основного аутокринного ростового фактора Т-клеток. Дальнейшая дифференцировка Т-лимфоцитов зависит от цитокинового окружения, в котором они находятся [10, 18, 29, 89].

Так, в присутствии IL-12 и IL-27, секретируемых АПК при контакте с *M. tuberculosis*, происходит запуск клеточно-опосредованного иммунного ответа с активацией Th0 в направлении Th1-лимфоцитов [272]. При этом именно данной субпопуляции Т-хелперов отводится главная эффекторная функция в борьбе с внутриклеточно локализованным возбудителем туберкулеза. Th1-лимфоциты осуществляют регуляцию многих реакций клеточного иммунитета, включая гиперчувствительность замедленного типа, активацию цитотоксических лимфоцитов, NK-клеток, макрофагов и гранулоцитов [3, 69, 119, 158, 210]. Такой широкий спектр активности Th1 связан с их способностью секретировать ключевые цитокины клеточно-опосредованного иммунного ответа: TNF- $\alpha$ , IL-2 и интерферон (IFN)  $\gamma$  – основные медиаторы межклеточных взаимодействий,

обеспечивающие активацию и пролиферацию иммунокомпетентных клеток, их миграцию в очаг воспаления [25, 58, 73, 119]. Кроме того, Th1 стимулируют продукцию В-лимфоцитами опсонизирующих иммуноглобулинов (Ig) класса G – G2a и G3, способных склеивать *M. tuberculosis*, облегчая их фагоцитоз, а также самостоятельно блокировать бактерии путем образования комплекса «антиген-антитело» [13]. Идентифицировать Th1-лимфоцит среди других Т-хелперов можно при одновременном обнаружении транскрипционных факторов T-bet (*T-box expressed in T cells*) и STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) 4 [18, 247].

Th2 – субпопуляция дифференцированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет [42, 47]. Th2-лимфоциты способствуют активации В-клеток, стимулируют дифференцировку последних в плазматические клетки и секрецию ими больших количеств антител разных классов (преимущественно IgE) и цитокинов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), тем самым участвуя в развитии аллергических реакций и активации эозинофилов [9, 16, 46, 214, 242, 243]. Зрелые Th2 характеризуются наличием в них факторов транскрипции STAT6 и GATA-3 (*trans-acting T-cell-specific transcription factor 3*) [18, 25, 247]. Известно, что Th2-опосредованный иммунный ответ наиболее эффективен против внеклеточных патогенов, таких как бактерии и паразиты. В аспекте ТЛ этот факт становится актуальным в момент бактериемии, которая характерна для диссеминированной формы заболевания. В период бактериемии *M. tuberculosis* локализуется вне фагоцита и доступна для действия антител, что и является стимулом для активации иммунного Th2-ответа [14, 23, 27, 34, 150]. Гиперпродукция антител, в свою очередь, ингибирует клеточный иммунитет и тем самым снижает защитный потенциал организма против возбудителя инфекции [12, 38]. Кроме того, секреция Th2-цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и других, в целом оказывает негативное влияние на течение ТЛ [29, 73, 202, 226].

Участие В-клеток в иммунном ответе на *M. tuberculosis* опосредовано их связью, помимо Th2-лимфоцитов, с функциональной активностью фолликулярных Т-хелперов гуморального иммунного ответа – Tfh-клеток. IL-6,



секретируемый Th2-лимфоцитами, стимулирует экспрессию в Tfh транскрипционного фактора Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6 protein*), который и контролирует их дифференцировку. Как описывалось ранее, основная задача производных В-лимфоцитов (плазматических клеток) при ТЛ заключается в образовании антител, специфичных к антигенам внеклеточно расположенных патогенов, вызывающих нейтрализацию антигена или его деструкцию путем антител-зависимых реакций (фагоцитоз, активация комплемента, клеточная цитотоксичность). Несмотря на то, что контакт В-лимфоцитов с патогенами и их продуктами возможен в очагах их поступления в организм (в барьерных тканях), вовлечение этих клеток в иммунный ответ происходит только во вторичных лимфоидных органах, поскольку здесь создаются оптимальные условия для взаимодействия антигена, наивной В-клетки и Tfh. Это взаимодействие происходит в межфолликулярном пространстве вторичных лимфоидных органов, где В- и Т-лимфоциты соседствуют друг с другом. Антиген доставляется в эти зоны с лимфой, как в составе молекул МНС на поверхности дендритных клеток, так и в свободной форме. Тем не менее, связывания свободного антигена недостаточно для активации В-клетки. Установлено, что Tfh-лимфоциты несут на своей поверхности хемокиновый рецептор CXCR5 (*C-X-C chemokine Receptor type 5*), не экспрессирующийся на других Т-лимфоцитах, но характерный для В-клеток. С помощью данного рецептора и соответствующего ему хемокина CXCL13 (*C-X-C motif chemokine 13*), В-клетки избирательно накапливаются в В-зоне вторичных лимфоидных органов, куда, используя указанный рецептор, могут входить Tfh-лимфоциты и контактировать с В-лимфоцитами. «Иммунологический синапс» образуется строго между одним Tfh и одним В-лимфоцитом и именуется «моногомным». В отличие от контакта дендритной клетки со многими Т-лимфоцитами, В-лимфоциту достаточно проконтактировать с одним Tfh и он превращается в плазматическую клетку, синтезирующую высокоаффинные антитела [33, 36, 109, 184, 246].

Совсем недавно была идентифицирована еще одна субпопуляция Т-хелперов, которая в присутствии IL-4 и трансформирующего фактора роста (TGF)

$\beta$ , продуцируемых Th2-лимфоцитами, способна дифференцироваться из Th0 в линию Т-клеток, секретирующих IL-9 (преимущественно), IL-10, IL-4, IL-5 и IL-13. Данная субпопуляция Т-лимфоцитов получила название Th9-клеток [31, 145, 222, 244]. Маркерным транскрипционным фактором для данной субпопуляции Т-хелперов является PU.1, который и отвечает за экспрессию гена IL-9 в Th9-лимфоцитах [262]. Патофизиологические функции клеток Th9 при ТЛ на сегодняшний день не исследованы, однако существует предположение, что повышенная секреция ими IL-9 может способствовать развитию инфекции [88].

Еще менее изученной является новая субпопуляция CD4<sup>+</sup> лимфоцитов – Th22, обнаруженная в результате исследований образцов кожи, полученных от больных псориазом, атопическим дерматитом и аллергическим контактным дерматитом. Название новый тип лимфоцитов получил в связи с тем, что его свойства тесно связаны с IL-22, на продукции которого данные клетки специализируются [261]. Экспансия Th22-клеток зависит от транскрипционного фактора AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*). О патофизиологической роли данного типа клеток на сегодняшний день отмечается лишь то, что они ускоряют восстановительные процессы в тканях и активируют защитные реакции клеток кожи, усиливают барьерную ее функцию, стимулируя выработку коллагена [230]. Существует предположение, что Th22-лимфоциты могут играть важную роль в иммунном ответе против *M. tuberculosis* [118].

С другой стороны, при исследовании особенностей иммунопатогенеза ТЛ особое внимание уделяется другой субпопуляции CD4-позитивных клеток – Treg, обладающих иммуносупрессорной активностью и оказывающих влияние на характер течения антигенспецифического иммунного ответа [25, 29, 194, 201, 224, 240]. Наряду с некоторыми транскрипционными факторами, свойственными другим Т-клеткам, большая часть Treg экспрессирует фактор FoxP3 (*Forkhead Box P3*) [18, 45, 247]. Существует мнение, что опосредованное Treg угнетение дифференцировки Th0 и пролиферации Th1 лежит в основе формирования Т-клеточной и туберкулиновой анергии у больных ТЛ [239]. Субпопуляция регуляторных Т-клеток, к которым относятся Treg, неоднородна в своем составе.

В соответствии с современными представлениями, они подразделяются на естественные, которые дифференцируются в процессе естественного развития организма вне антигенной стимуляции ( $\gamma\delta$ T-клетки, NKT-клетки и Treg-клетки), и адаптивные, или индуцированные, формирующиеся в ходе иммунного ответа (Tr1, Th3,  $CD8^+CD28^-$  и Treg). Осуществление данными клетками супрессорного эффекта возможно путем прямого контакта Treg с клеткой-мишенью, путем секреции иммунорегуляторных цитокинов, таких как IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , а также посредством влияния на апоптоз и пролиферацию лимфоцитов [6, 14, 15, 39, 104, 111, 206, 255, 271, 277]. Многочисленными исследованиями показано, что количество Treg в крови у больных ТЛ значительно увеличивается [6, 14, 30, 72], что, несомненно, играет важную роль в иммунопатогенезе заболевания.

Особое внимание исследователей в аспекте туберкулезной инфекции на сегодняшний день привлекают Т-лимфоциты-хелперы типа 17. Свое название данные клетки получили за способность секретировать IL-17 [20, 209, 258, 259]. Данный цитокин способствует продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , а также металлопротеиназ, хемокинов и других медиаторов воспаления [49, 127, 129]. Наряду с IL-17, Th17-лимфоциты являются продуцентами IL-22, индуцирующего секрецию антимикробных пептидов нейтрофилами, в том числе белков острой фазы воспаления [91, 166, 170, 209]. Происходящие при действии Th17-цитокинов активация и привлечение в очаг воспаления нейтрофилов, макрофагов и Th1-лимфоцитов способствуют отграничению зоны повреждения в легких и элиминации *M. tuberculosis* [132].

Участие Th1, Th2 и регуляторных Т-лимфоцитов в иммунопатогенезе ТЛ достаточно широко представлено в литературе, а функциональная активность Tfh и Th9 тесно связана с Th2-лимфоцитами и опосредует, главным образом, гуморальный тип иммунного ответа. Значимость Th22-клеток трактуется в первую очередь в аспекте кожных заболеваний. В то же время функциональный потенциал Th17-лимфоцитов и недостаточная освещенность в литературе участия данных клеток в иммунном ответе против *M. tuberculosis* обуславливают

фундаментальную и практическую значимость исследований в этой области.

## **1.2 Общая характеристика и секреторная активность**

### **Th17-лимфоцитов**

#### **1.2.1 Фенотипические особенности Th17-лимфоцитов**

История открытия Th17-лимфоцитов начинается с 2003 года, когда S. Aggarwal и его коллегами было показано, что IL-23 способствует развитию Т-клеток, отличающихся от Th1 и Th2 тем, что они секретируют IL-17 [171]. В 2005 году L.E. Harrington и H. Park независимо друг от друга пришли к выводу о том, что наивные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты могут дифференцироваться в IL-17-продуцирующие клетки *in vivo* и *in vitro*, формируя субпопуляцию Т-клеток, отличающуюся от Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 и 2 – Th1 и Th2 [49, 164]. Эти данные послужили основанием для выделения Th17-лимфоцитов в отдельную субпопуляцию Т-клеток, после чего началось активное исследование их роли в патогенезе различных заболеваний. Интенсивное изучение Th17-лимфоцитов в последующие годы позволило установить источники их происхождения, факторы пролиферации и пути дифференцировки, функциональные особенности, а также роль в защите организма при действии разнообразных патогенов [17].

На сегодняшний день известно, что Th17-лимфоциты вовлечены в иммунопатогенез множества заболеваний различной этиологии. Так, показано, что данная субпопуляция Т-клеток участвует в механизмах развития ряда аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, гранулематоз Вегенера и др. [143, 193, 259]. В последнее время появляются данные об их участии в защите макроорганизма от внеклеточных бактерий и грибов, а также от вирусных инфекций [24, 44, 54, 219, 275]. Кроме того, имеются сведения о вкладе Th17-лимфоцитов в формирование протективного иммунного ответа на внутриклеточные патогены, в частности *M. tuberculosis* [24, 54, 176, 219].

Известно, что основным транскрипционным фактором, направляющим

дифференцировку Th0 по пути Th17, является ROR (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*) C2 (у человека) и ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$  (у мышей) [17, 20, 45, 67, 238]. Установлено, что фактор ROR $\gamma$ t у мышей активируется во время дифференцировки антиген-стимулированных Th в направлении Th17 под влиянием IL-6 и TGF- $\beta$ . В условиях дефицита IL-6 Т-клетки не экспрессируют фактор ROR $\gamma$ t и не синтезируют IL-17 [180]. В свою очередь IL-6 опосредует свое действие за счет активации фактора транскрипции STAT3. При этом недостаток именно фактора STAT3 приводит к нарушению экспрессии в клетках ROR $\gamma$ t, что свидетельствует о STAT3-зависимой индукции дифференцировки Th17-лимфоцитов [5, 219, 231, 238].

Важность фактора транскрипции STAT3 в дифференцировке Th17-лимфоцитов была показана на моделях мышей, дефицитных по SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) 3, который является белком-супрессором для STAT3. Такие мыши демонстрировали высокую продукцию IL-17, связанную с повышенной экспрессией фактора STAT3 в ответ на действие IL-23, который связывался с промотором гена IL-17 и способствовал его экспрессии [229]. Также было продемонстрировано, что гиперэкспрессия STAT3 способствовала дифференцировке Th17-лимфоцитов, в то время как дефицит фактора ослаблял их дифференцировку *in vivo* и *in vitro* [147, 231]. Кроме того, STAT3 необходим для IL-6-опосредованной экспрессии IL-21, также необходимого для дифференцировки Th17. Таким образом, считается, что транскрипционный фактор STAT3 передает сигналы от IL-6, IL-21 и IL-23, способствующих экспрессии ROR $\gamma$ t и RORC2 [231, 238]. У человека было показано, что мутация STAT3 опосредует нарушение Th17-ответа [152].

Учитывая, что фактор STAT3 экспрессируется в различных клетках иммунной системы (NK-клетки, Т- и В-лимфоциты), маркерным транскрипционным фактором для Th17-лимфоцитов человека считается RORC2. Хотя совсем недавно была идентифицирована популяция ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-клеток, относящихся к регуляторным Т-клеткам (в данном случае ROR $\gamma$ t упоминался как фактор транскрипции человека). Они могут обладать иммуносупрессорным

действием, либо секретировать IL-17 в значительных количествах, поддерживая воспаление, что зависит от локального микроокружения [117, 275].

Говоря о фенотипических особенностях Th17-лимфоцитов, следует отметить, что они являются CD161-позитивными [103]. CD161 – лектиновый рецептор, имеющий на сегодняшний день два известных лиганда. Первый из них – лектинодоподобный транскрипт-1 – белок, необходимый для индукции секреции Th17-лимфоцитами после связывания с CD161, а также для трансэндотелиальной миграции клеток в ткани. Другой лиганд – PILAR (*Proliferation-Induced Lymphocyte-Associated Receptor*) усиливает в Th17-лимфоцитах экспрессию антиапоптотических белков bcl-2 и bcl-xl, стимулирует секрецию клетками IFN- $\gamma$  и провоспалительных хемокинов [62, 67, 208]. L. Maggi с коллегами показано, что Th17-лимфоциты человека характеризуются высокой экспрессией рецептора для IL-23 (IL-23R), молекулы CD161 и фактора транскрипции RORC2 и формируются из CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> предшественников Т-клеток в ответ на стимуляцию IL-1 $\beta$  и IL-23 [67, 207].

К поверхностным маркерам Th17-лимфоцитов, помимо лектинового рецептора CD161, относятся рецепторы к хемокинам CCR (*C-C chemokine Receptor*) 4 и CCR6 [37, 207]. Помимо Th17-клеток, CCR4 представлен на поверхности Th2-лимфоцитов и Treg, а CCR6 также экспрессируется на других Т-клетках, В-лимфоцитах, NK и дендритных клетках. Данные рецепторы относятся к суперсемейству хемокиновых рецепторов, структурно представлены семью трансмембранными доменами и ассоциированы с G-белками. Хемокин CCL (*chemokine (C-C motif) Ligand*) 20 является специфическим хемокиновым лигандом для CCR6. CCL20 экспрессируется в различных типах эпителиальных клеток, таких как кератиноциты, эпителиальные клетки легких и кишечника. Из иммунокомпетентных клеток CCL20 избирательно экспрессируется только в Th17-лимфоцитах. Лигандом для CCR4 является хемокин CCL22. Хемокины, обладая хемоаттрактантными свойствами, через специфические рецепторы регулируют миграцию клеток иммунной системы в очаг воспаления [66, 100, 207, 225, 254].

Из костимуляторных молекул для Th17-лимфоцитов характерна высокая экспрессия белков ICOS (*Inducible COStimulator*). ICOS – член семейства CD28 костимуляторных молекул, необходимый для осуществления рецептор-опосредованной активации Т-клеток. Макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты конститутивно экспрессируют ICOS-L – лиганд для костимуляторной молекулы, взаимодействие которых является сигналом, «разрешающим» активацию Т-лимфоцитов. Активация ICOS индуцирует транскрипционный фактор c-Maf, который регулирует синтез в Th17-клетках IL-21 – важного фактора дифференцировки Th17-лимфоцитов. Вместе с тем молекулы ICOS необходимы для IL-23-опосредованного поддержания функциональной активности уже дифференцированных клеток [246].

Помимо описанных выше молекул, на поверхности Th17-клеток экспрессируется большое количество хемокиновых рецепторов CCR5, CXCR (C-X chemokine Receptor) 4 и CXCR6 [207].

### **1.2.2 Механизмы цитокин-зависимой активации и дифференцировки Th17-лимфоцитов**

Известно, что различные субпопуляции Т-хелперов являются достаточно пластичными и на ранних этапах развития могут дифференцироваться друг в друга. Подобные трансформации зависят от микроокружения, в котором клетки находятся, и главным образом, от влияния цитокинов того или иного профиля. После открытия Th17-лимфоцитов как отдельной субпопуляции Т-хелперов, огромное количество исследований было посвящено изучению цитокинов, способствующих активации и дифференцировке данных клеток [37, 47, 62, 89, 252].

До недавнего времени существовало много дискуссионных вопросов относительно цитокиновой регуляции созревания Th17-лимфоцитов. Главным образом это касалось особенностей модулирующего влияния TGF- $\beta$  на процессы

активации и дифференцировки Th17-клеток. Приводились данные о позитивном эффекте TGF- $\beta$  [146], описывались и результаты ингибирующего влияния данного цитокина [79, 173, 204]. Позже стало известно, что эффекты TGF- $\beta$  сильно зависят от его концентрации. В низких дозах TGF- $\beta$  способствует дифференцировке Th17-лимфоцитов, в то время как высокие концентрации цитокина подавляют их развитие и стимулируют дифференцировку Treg [260]. На сегодняшний день доказано, что TGF- $\beta$  в сочетании с IL-6 индуцирует дифференцировку наивных T-клеток периферической крови в Th17-клетки. Вероятно, присутствие в среде IL-6 является критическим фактором, благодаря которому TGF- $\beta$  стимулирует развитие Th17. Наличие же в среде TGF- $\beta$  в иммунологических концентрациях является благоприятным, но не обязательным фактором для дифференцировки Th17-клеток [7, 121, 159, 205, 219, 252, 274]. IL-6, связываясь с комплементарным ему рецептором на поверхности Th0-лимфоцита, способствует активации рецептор-ассоциированных янус-киназ JAK (*janus kinase*) 2 и TYK (*tyrosine kinase*) 2. Данные тирозинкиназы фосфорилируют фактор транскрипции STAT3, находящийся в цитоплазме в неактивном состоянии. После фосфорилирования и димеризации STAT3 транспортируется в ядро клетки и запускает экспрессию транскрипционного фактора RORC2, специфичного для Th17-лимфоцитов. Параллельно экспрессию RORC2 поддерживает TGF- $\beta$ , действуя через факторы транскрипции Smad (*Mothers against decapentaplegic homolog*). Кроме того, совместное влияние IL-6 и TGF- $\beta$  также способствует экспрессии гена IL-21 и IL-23R на поверхности Th17-клеток, что крайне необходимо для дальнейшего поддержания Th17-субпопуляции [271]. Кроме того, TGF- $\beta$  поддерживает формирование пула Th17, ограничивая дифференцировку Th1- и Th2-лимфоцитов путем ингибирования синтеза IFN- $\gamma$  и IL-4, а также путем ограничения экспрессии факторов транскрипции T-bet/STAT4 и GATA3/STAT6 соответственно [269].

Как упоминалось ранее, IL-6 через фактор транскрипции STAT3 регулирует экспрессию гена IL-21. В свою очередь, в отсутствие IL-6 по мере накопления IL-21 в среде, данный цитокин совместно с TGF- $\beta$  способен поддерживать



дифференцировку Th17-лимфоцитов посредством индукции транскрипционного фактора ROR $\gamma$ t и экспрессии IL-23R [96, 159, 246]. При этом Th17 сами способны продуцировать IL-21, осуществляя таким образом аутокринную регуляцию собственной функциональной активности по принципу положительной обратной связи [20, 246]. Помимо Th17 важными продуцентами IL-21 являются Tfh-клетки [246]. Многочисленными исследованиями показано, что дефицит IL-21 или его рецептора нарушает дифференцировку Th17 [74, 133, 135, 147] вследствие недостаточной экспрессии IL-23R, фактора ROR $\gamma$ t и дефицита IL-17 [20], то есть IL-21 необходим для полной реализации провоспалительного фенотипа Th17-клеток. Как упоминалось ранее, синтез IL-21 в Th17 связан с рецепторной молекулой ICOS и транскрипционным фактором c-Maf. Имеются данные, что экспрессия фактора c-Maf в Th17-лимфоцитах в 500 раз выше, чем в Th1- и Th2-клетках [246]. Вместе с тем недавно появились данные, что для продукции IL-21 Th17-клетками необходим фактор транскрипции STAT3 [135, 266].

Подобно ситуации с TGF- $\beta$ , не менее спорным считался вопрос относительно участия IL-23 в развитии и функционировании Th17-лимфоцитов. Ранее полагали, что IL-23, секретируемый дендритными клетками, является ключевым цитокином и стимулирует дифференцировку Th17 [164]. Однако результаты последних исследований показали, что, скорее всего, IL-23 необходим исключительно для стабилизации фенотипа и пролиферации дифференцированных Th17-лимфоцитов, так как рецепторы к данному цитокину экспрессируются на клетках, уже активированных при участии IL-6 и TGF- $\beta$  или IL-21 и TGF- $\beta$  [86, 207, 219, 246, 252, 271, 274]. Механизм внутриклеточной передачи сигнала Th17-лимфоцитам с участием IL-23 в целом сходен с сигнальной трансдукцией IL-6. Тирозиновые киназы JAK2 и TYK2, ассоциированные с IL-23R, активируют цитоплазматические факторы транскрипции STAT3 и STAT4, которые после фосфорилирования и формирования гомодимеров транспортируются в ядро клетки, связываются с промоторами генов-мишеней и запускают их экспрессию. Подобным образом IL-23 способствует синтезу в Th17-клетках IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и основного цитокина

данной субпопуляции лимфоцитов – IL-17 [18, 77, 257, 266].

Рассматривая вопрос об интерлейкинах, принимающих участие в активации и дифференцировке Th17-лимфоцитов, важно упомянуть и цитокины семейства IL-1: IL-1 $\beta$  и IL-18 [7, 157, 159, 219]. IL-1 $\beta$  – классический провоспалительный цитокин, основными продуцентами которого являются моноциты/макрофаги, в меньшей степени – В-лимфоциты и нейтрофилы [47]. При исследовании процесса дифференцировки Th17-клеток в образцах крови человека *in vitro*, E.V. Acosta-Rodrigues и соавторы выявили, что IL-1 $\beta$  и IL-6, продуцируемые в большом количестве активированными моноцитами и дендритными клетками, необходимы для формирования пула Th17 [173]. Использование в данном исследовании антител, нейтрализующих IL-1 $\beta$  и IL-6, приводило к блокировке созревания Th17-лимфоцитов. Кроме того, IL-1 $\beta$  совместно с IL-23 усиливают продукцию Th17-клетками IL-17 [17, 48, 148]. IL-1 $\beta$  способен супрессировать ингибиторный эффект IL-2 на продукцию IL-17 через индукцию экспрессии IL-1R, IL-23R и RORC2 [219]. IL-1 $\beta$ -сигналинг в Т-клетках реализуется с участием транскрипционного фактора IRF (*Interferon Regulatory Factor*) 4. IL-1 $\beta$ , взаимодействуя с комплементарным ему рецептором на поверхности Th17-лимфоцита, запускает серию внутриклеточных каскадных реакций, в ходе которых активируется транскрипционный фактор IRF4, который в ядре клетки способствует экспрессии фактора транскрипции, специфичного для Th17 – RORC2 [80, 217]. О другом цитокине семейства IL-1 – IL-18 известно, что его присутствие необходимо в IL-23-опосредованном пути формирования субпопуляции IL-17-продуцирующих Т-лимфоцитов [219, 274].

Среди негативных регуляторов активации и дифференцировки Th17-лимфоцитов отмечают, главным образом, IL-4, ответственный за развитие Th2-лимфоцитов, а также IL-12 и IL-27, направляющие дифференцировку Th0-клеток по Th1-пути [192, 219, 241].

Таким образом, направление дифференцировки Th-лимфоцитов напрямую зависит от цитокинового микроокружения. Для дифференцировки наивных Т-клеток по пути Т-лимфоцитов-хелперов типа 17 необходимо присутствие в среде

IL-6 и/или IL-21 в комбинации с TGF- $\beta$ . При этом TGF- $\beta$  не должно быть много, поскольку высокие концентрации фактора способствуют формированию пула регуляторных Т-лимфоцитов. Важными для дифференцировки Th17-лимфоцитов считаются цитокины семейства IL-1: IL-1 $\beta$  и IL-18. Вместе с тем для поддержания функциональной активности зрелых Th17-клеток необходим секретируемый дендритными клетками IL-23.

### 1.2.3 Th17-цитокины: строение, рецепторы, биологическая активность

Th17-лимфоциты, принимая участие в развитии воспалительных процессов, играют важную роль в защите от ряда микроорганизмов. В частности, ввиду способности данной линии Т-клеток контролировать процессы активации и миграции в очаг воспаления нейтрофилов, их ответ важен для уничтожения внеклеточных патогенов. В то же время они способствуют разрушению тканей при различных аутоиммунных расстройствах. При инфекциях, вызванных бактериями и грибами, Th17-ответ является важным механизмом, детерминирующим защиту слизистых оболочек и обеспечивающим активацию их барьерных функций [106, 257]. Однако стоит отметить, что у Th17-лимфоцитов отсутствуют прямые механизмы, посредством которых они могли бы уничтожать того или иного возбудителя, что характерно, например, для НК-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов (перфорин-гранзимовый механизм) [210]. Весь спектр эффектов данной линии Т-клеток связан с секретируемыми ими цитокинами [123, 175, 257].

Цитокины (*cytokines*) [от греч. *cytos* – клетка и *kineo* – двигаю, побуждаю] – большая группа гормоноподобных медиаторов белковой природы, с помощью которых клетки иммунной системы могут обмениваться друг с другом информацией и осуществлять, тем самым, координацию иммунного ответа. Попадание в организм патогена приводит к продукции и секреции клетками врожденного иммунитета разнообразных цитокинов, которые опосредуют формирование субпопуляций эффекторных клеток, их миграцию в очаг

инфекции и индукцию тканеспецифичных механизмов защиты, а также инициации адаптивного иммунитета, способствующего уничтожению патогена и формированию иммунологических клеток памяти [113].

Основными цитокинами Th17-лимфоцитов человека считаются, главным образом, IL-17 и IL-22, а также IL-6, IL-26 и хемокин CCL-20. Кроме того, имеются данные о способности Th17 секретировать TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  [82, 83, 87, 122, 131, 175, 254].

Необходимо отметить, что ключевой цитокин Th17-клеток – IL-17 – может секретироваться и множеством других клеток: нейтрофилами, Т-клетками памяти, NKT-клетками,  $\gamma\delta$ T-лимфоцитами, эозинофилами, моноцитами и макрофагами, тучными клетками, миоцитами стенки сосудов [115, 123, 125, 175, 218, 237]. Цитокиновое семейство IL-17 включает шесть членов – собственно IL-17 (также называемый IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (или IL-25) и IL-17F. В отличие от Th17-лимфоцитов, выделенных в отдельную Т-клеточную субпопуляцию сравнительно недавно, данные о строении и функциях IL-17 были известны гораздо раньше. Человеческий IL-17A впервые клонирован в 1995 году [112, 159] и первоначально был известен как антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 8 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 8*, CTLA-8) [25, 253]. В ранних работах показаны его воспалительные и гемопоэтические эффекты, действие на эпителиальные, эндотелиальные клетки и фибробласты [232]. Вскоре было выделено целое семейство цитокинов IL-17, обладающих высокой степенью структурного сходства [253]. Вес их молекул составляет 20-30 кДа. Все они состоят из 163-202 аминокислотных остатков и на 20-50% являются гомологами IL-17A. Молекулы несут консервативную область с остатками цистеина, участвующими в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей. Все члены семейства IL-17 секретируются в виде гомо- или гетеродимеров. При этом гомодимеры, например, IL-17A и IL-17F, обладают более высокой биологической активностью, чем их гетеродимеры [70, 87].

IL-17A представляет собой гликопротеин, состоящий из 155 аминокислотных остатков и секретируемый в форме гомодимера [25] (рисунок 1).

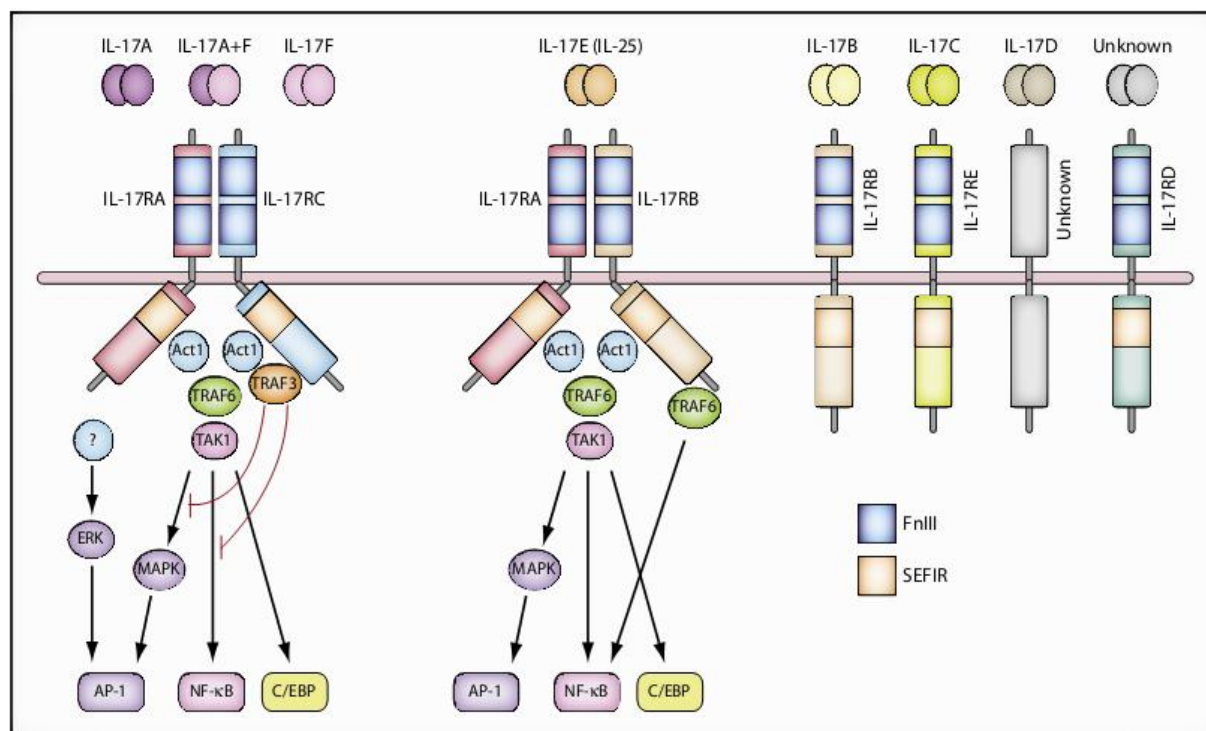


Рисунок 1 – Цитокины семейства IL-17 и их рецепторы  
[по данным Y. Iwakura et al., 2011].

*Примечание* – Act1 – активатор 1; AP-1 – активирующий протеин 1; C/EBP – ССААТ/энхансер-связывающий белок; ERK – киназа, регулирующая внеклеточный сигнал; FnIII – фибронектин III-подобный домен; IL – интерлейкин; MAPK – митоген-ассоциированная протеинкиназа; NF-κB – ядерный транскрипционный фактор каппа В; TRAF – фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли; TAK – киназа, активирующая трансформирующий фактор роста бета; SEFIR – домен, опосредующий экспрессию генов фактора роста фибробластов и рецептора к интерлейкину-17.

На сегодняшний день считается, что основной функцией IL-17A является участие в воспалении, вызванном различными возбудителями инфекционной природы, а также при аутоиммунных заболеваниях. Имеются данные, что цитокин принимает участие в развитии протективных иммунных реакций против *M. tuberculosis* [122, 123, 132, 175, 178, 219, 245, 259]. Неиммунные клетки, такие как фибробласты и эпителиальные клетки, а также гематopoэтические стволовые клетки и макрофаги являются прямыми мишенями для IL-17A, который способствует образованию в них множества провоспалительных цитокинов и хемокинов. Так, IL-17A активирует продукцию макрофагами IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-

CSF) и других факторов воспаления [83, 129]. Показано, что IL-17A вызывает увеличение экспрессии мРНК циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2). ЦОГ-2 – фермент, участвующий в синтезе эйкозаноидов, таких как простагландины, простациклины и тромбоксаны. При увеличении концентрации ЦОГ-2 происходит усиление воспалительных реакций [162]. Поддержание воспаления с участием IL-17A также возможно за счет участия цитокина в продукции муцинов, белков острой фазы воспаления и антимикробных пептидов [122]. Кроме того, IL-17A повышает экспрессию адгезивных молекул LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen*) на лимфоцитах, макрофагах и дендритных клетках, а также рецептора к ним – ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*) – на активированных лимфоцитах, усиливая Т-клеточную активацию [253]. Конечной целью вышеописанных эффектов IL-17A является привлечение иммунокомпетентных клеток (преимущественно нейтрофилов и макрофагов) в очаг воспаления и реализация в поврежденных тканях специфических клеточных реакций.

IL-17F является наиболее близким гомологом IL-17A, повторяя до 55% его аминокислотной последовательности. Гены, кодирующие IL-17A и IL-17F, располагаются рядом в одной хромосоме [128, 133, 268]. Кроме того, согласно последним данным, Т-клетки человека и мышей способны продуцировать как гомодимер IL-17F/F, так и IL-17A/F – гетеродимер, потенциально оказывающий провоспалительные эффекты [105, 116]. В настоящее время о провоспалительных эффектах IL-17F известно не так много. IL-17F индуцирует продукцию фагоцитами IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Установлено, что IL-17F совместно с IL-17A индуцируют продукцию мезангиальными клетками хемокинов (моноцитарного хемотаксического протеина (MCP) 1 и макрофагального провоспалительного белка (MIP) 2) посредством MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) – сигнального пути с участием транскрипционных факторов AP (*Activator Protein*) 1, NF (*Nuclear Factor*)  $\kappa$ B и C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) [127, 228] (рисунок 1). Реализация, по крайней мере, части провоспалительных потенциалов IL-17F осуществляется через активацию матриксных металлопротеиназ и привлечения нейтрофилов в очаг воспаления. Нейтрофилы, в свою очередь,

активируют металлопротеиназы, протеазы и желатиназы, что приводит к повреждению тканей и дальнейшему привлечению в очаг альтерации нейтрофилов, моноцитов и макрофагов [105, 123].

IL-17E является наиболее отличающимся от других цитокинов семейства IL-17. Интерлейкин представляет собой гомодимер (рисунок 1), состоящий из 177 аминокислот. Уникальность IL-17E состоит в том, что он стимулирует *in vivo* продукцию практически всех молекул, участвующих в реакции гиперчувствительности немедленного типа [18]. Таким образом, IL-17E способствует поддержанию эозинофильной инфильтрации очага инфекции и усилению Th2-опосредованного иммунного ответа, тем самым данный цитокин участвует в иммунопатогенезе аллергических заболеваний и защите организма от гельминтов. Усиление Th2-ответа в присутствии IL-17E связано с влиянием последнего на дифференцировку Th2-лимфоцитов посредством активации раннего синтеза IL-4, IL-5 и IL-13, а также со стимуляцией В-клеток и синтеза последними IgE и IgG1. Важно отметить, что IL-17E способен ограничивать дифференцировку Th17-клеток через индукцию экспрессии IL-13 и, напротив, ингибирование продукции IL-13 дендритными клетками [142]. Помимо Th17-лимфоцитов продуцентами IL-17E являются (в значительно меньшей степени) эпителиальные клетки легких, альвеолярные макрофаги, Th2-лимфоциты, NKT-клетки, эозинофилы и базофилы [71].

О структуре и биологической роли IL-17B, IL-17C и IL-17D на сегодняшний день известно не много. Данные белки содержат от 155 до 200 аминокислот и являются гомодимерами (рисунок 1). IL-17B экспрессируется преимущественно в поджелудочной железе и тонком кишечнике. IL-17C присутствует, главным образом, в тимусе, селезенке и простате человека. Выраженная экспрессия IL-17D наблюдается в скелетных мышцах, в меньшей степени в мозге, жировой ткани, сердце, легких и поджелудочной железе. Об эффектах IL-17B, IL-17C и IL-17D известно только то, что они способны индуцировать продукцию TNF- $\alpha$  [18].

Важно отметить, что из всех членов IL-17-семейства Th17-клетки человека секретируют только IL-17A и IL-17F [256].

Семейство рецепторов IL-17 включает 5 членов: IL-17RA (или IL-17R), IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD и IL-17RE, которые представляют собой трансмембранные белки, включающие экстрацеллюлярный и трансмембранный домены, а также цитоплазматический хвост. IL-17A, IL-17F и гетеродимер IL-17A/F опосредуют свои функции через гетеродимерный комплекс IL-17RA/IL-17RC. Отсутствие одной из этих субъединиц рецептора полностью отменяет провоспалительный эффект IL-17A и IL-17F. При этом IL-17A связывается с субъединицей IL-17RA в 10-100 раз сильнее, чем IL-17F, тогда как связывающая способность двух этих цитокинов с IL-17RC приблизительно одинакова [122]. Субъединицы IL-17RA и IL-17RB формируют рецептор для IL-17E. При этом IL-17E обладает высокой связывающей способностью преимущественно с субъединицей IL-17RB. С другой стороны, передача сигнала от IL-17B внутрь клетки также осуществляется при помощи IL-17RB, однако в данном случае субъединица IL-17RA не требуется. Аналогично представлен и рецептор для IL-17C, структуру которого формирует единственная субъединица – IL-17RE. Вместе с тем на сегодняшний день неизвестна структура рецептора для IL-17D. Интересен тот факт, что обнаружен рецептор IL-17RD, лиганд для которого неизвестен, но доказано, что IL-17D не обладает сродством к данному рецептору (рисунок 1) [71, 105, 113].

Экстрацеллюлярная область всех рецепторов семейства IL-17 содержит домен FnIII (*Fibronectin type III*), а цитоплазматический хвост включает другой уникальный мотив – SEFIR [SEF (*Similar Expression to Fibroblast growth factor genes*) and IL-17R] домен [81, 234]. Активация непосредственно домена SEFIR после взаимодействия рецептора с IL-17A, IL-17F и IL-17E запускает механизмы внутриклеточной сигнальной трансдукции с участием белков Act (*activator*) 1, TRAF (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor*) 3 и 6, киназ TAK (*Transforming growth factor beta-Activated Kinase*) 1, ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) и MAPK и последующей активацией факторов транскрипции AP-1, NF-κB и C/EBR, реализующих эффект цитокинов семейства IL-17. Механизмы сигнальной трансдукции IL-17B, IL-17C и IL-17D на сегодняшний



день находятся на этапе изучения [81, 105, 228, 234].

Другой важный цитокин Th17-лимфоцитов – IL-22 является представителем семейства IL-10, однако, несмотря на очевидную общность в строении, обладает существенно отличающейся биологической активностью. Структуру цитокина формируют 147 аминокислот. Мембранный рецептор IL-22 (IL-22R) представляет собой гетеродимерный комплекс, состоящий из двух субъединиц: уникальной IL-22R1 и общей IL-10R2. IL-22 непосредственно взаимодействует с субъединицей IL-22R1, что влечет за собой конформационные изменения и присоединение второй субъединицы – IL-10R2. Присоединение IL-10R2 абсолютно необходимо для реализации IL-22-опосредованной сигнальной трансдукции и отсутствие данной субъединицы приводит к неспособности клетки отвечать на стимуляцию цитокином [138, 181, 254]. Во внеклеточном пространстве IL-22 формирует димеры и связывается с двумя субъединицами IL-22R1 [136, 167].

После взаимодействия с комплементарным рецептором, IL-22 индуцирует фосфорилирование тирозиновых киназ JAK1 и TYK2, в последующем фосфорилирующие факторы транскрипции STAT3 (преимущественно), STAT1 и STAT5 (в меньшей степени), проявляющие транскрипционную активность в ядре Th17-клетки. Кроме того, подобно сигнальному пути IL-17, IL-22 индуцирует каскад MAP-киназы [168]. Описан также растворимый рецептор – IL-22-связывающий белок (IL-22BP, или IL-22R2), который может действовать как эндогенный ингибитор активности цитокина *in vivo*. При этом растворимый IL-22R2 имеет более высокую связывающую способность с IL-22, чем мембранная субъединица IL-22R1 [136].

К клеткам иммунной системы, способным секретировать IL-22, относятся  $\gamma\delta$ T-клетки, NK, NKT, Th1-, Th2-, Th17- и Th22-лимфоциты [65, 108]. Однако имеются данные, что Th17-клетки продуцируют цитокин в 100 и в 1000 раз интенсивнее, чем Th1 и Th2 соответственно [136, 163]. IL-23, секретируемый АПК, является главным индуктором синтеза и секреции IL-22 посредством участия в активации фактора STAT3. Важным для продукции IL-22 является также транскрипционный фактор AHR. Данный фактор специфично

экспрессируется в Th17- и Th22-лимфоцитах, усиливает их поляризацию и отвечает непосредственно за активацию IL-22-кодирующих генов. Мыши с AHR-нокаутом дифференцируются в Th17, но не продуцируют IL-22 [55, 136, 244, 267].

Биологические эффекты IL-22 затрагивают многие ткани организма человека. Считается, что данный цитокин может обладать как про-, так и противовоспалительной активностью, при этом в ходе воспалительного процесса IL-22 предотвращает поражение тканей. Важной функцией IL-22 считается участие в антибактериальной защите. Цитокин стимулирует продукцию кератиноцитами антимикробных пептидов S100A7, S100A8, S100A9,  $\beta$ -дефензинов и кателицидина. Данный эффект важен в первую очередь для барьерных тканей, таких как кожа, дыхательные пути, кишечник, и необходим для защиты организма против вне- и внутриклеточных бактерий. Как провоспалительный фактор, IL-22 способствует рекрутированию клеток в очаг и стимулирует экспрессию IL-6, G-CSF, IL-1 и других факторов воспаления. Показано участие IL-22 в усилении продукции белков острой фазы печени. В параллель провоспалительному эффекту, доказана роль IL-22 в пролиферации, заживлении и репарации кожи. Данная функция осуществляется за счет способности цитокина регулировать экспрессию антиапоптотических генов *bcl-2* и *bcl-XL* и генов, кодирующих пролиферативный фактор c-Мус, циклины D1, CDK4, а также большого количества молекул, вовлеченных в защиту слизистых оболочек [136, 163, 169].

IL-26, также как и IL-22, принадлежит к семейству IL-10. IL-26 представляет собой полипептид из 171 аминокислоты и функционирует как моно- или гомодимер [144]. Рецепторный комплекс цитокина включает субъединицы IL-20R1 и IL-10R2. Передача активационного сигнала через рецептор к IL-26 осуществляется с участием янус-киназ JAK1, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT3, которые стимулируют в ядре клетки экспрессию генов, кодирующих IL-8 и IL-10, регулирующих иммунитет слизистых оболочек. Через индукцию секреции IL-1 $\beta$  макрофагами и дендритными клетками IL-26 стимулирует дифференцировку Th17-клеток. Основными клетками продуцентами

IL-26 считаются, главным образом, Th17-лимфоциты, в меньшей степени Th1-клетки, NK и макрофаги. При этом индуктором синтеза и секреции IL-26, аналогично IL-22, выступает секретируемый АПК IL-23 [18, 143, 144, 254]. Исследованиями последних лет показано, что IL-26, секретируемый в очаге воспаления в легких, выступает в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов и других иммунокомпетентных клеток, способствуя их мобилизации и миграции в легкие [172].

Как уже упоминалось выше, IL-6, секретируемый Th17-лимфоцитами, по аутокринному механизму играет важную роль в жизнедеятельности данной клеточной субпопуляции Т-хелперов. Помимо Th17, продуцентами IL-6 являются другие Т-клетки, моноциты/макрофаги, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, фибробласты, кератиноциты. IL-6 считается плеiotропным цитокином, так как принимает участие в регулировании различных физиологических процессов, включая воспаление, гемопоэз и иммунные реакции [250]. Экспрессия гена IL-6 происходит под влиянием попадающих в организм вирусов, бактерий и их продуктов, а также провоспалительных цитокинов.

Основными иммунологическими проявлениями биологической активности IL-6 в организме являются: активация пролиферации В-лимфоцитов и синтеза антител; активация пролиферации Т-лимфоцитов за счет индукции экспрессии IL-2R и увеличения продукции IL-2, усиление функциональной активности NK-клеток; стимуляция гранулоцитарного ростка кроветворения; провоспалительное действие за счет активации экспрессии молекул адгезии на эндотелии и хемотаксиса лейкоцитов; активация синтеза острофазных белков в печени. По сравнению с другими цитокинами IL-6 является главным активатором синтеза большинства белков острой фазы воспаления в печени, тогда как IL-1 и TNF- $\alpha$  стимулируют лишь синтез отдельных белков и могут действовать опосредованно через IL-6 [18]. Недавние исследования показали, что присутствие IL-6 в среде способствует дифференцировке Th17-лимфоцитов с высокой IL-17-секреторной активностью [250].

Высокоаффинный рецепторный комплекс для IL-6 состоит из двух

субъединиц: специфичной для IL-6 – IL-6R и сигнал-передающей общей для всех членов семейства IL-6 субъединицы gp130. Для формирования функционально активного комплекса необходимо связывание двух молекул IL-6R с двумя молекулами IL-6 и далее ассоциация с двумя молекулами gp130. Субъединица IL-6R может существовать и в виде растворимой формы (sIL-6R). Вне клетки sIL-6R действует как агонист для IL-6, формируя sIL-6R/IL-6 комплекс, который может связываться с мембраной субъединицей gp130 и инициировать сигнальную трансдукцию [250].

Данные о биологической активности IL-21 и хемокина CCL-20, секретируемых Th17-лимфоцитами, приводились ранее (см. раздел 1.2.1, стр. 20).

Таким образом, Th17-цитокины преимущественно оказывают плеiotропные биологические эффекты на различные типы клеток, в основном участвуя в формировании и регуляции защитных реакций организма на местном и системном уровнях. Количество Th17-лимфоцитов и их цитокиновый профиль характеризуют состояние иммунной системы, что актуально при различных иммунозависимых неинфекционных и инфекционных заболеваниях, в том числе при туберкулезе легких.

### **1.3 Роль Th17-ассоциированных цитокинов в иммунопатогенезе туберкулеза легких**

Не вызывает сомнений, что неэффективная реализация Th1-зависимого иммунного ответа, как ключевого механизма в борьбе с *M. tuberculosis*, во многом определяет риск неблагоприятного исхода заболевания. В связи с этим, большой интерес у современных исследователей вызывают механизмы формирования противотуберкулезного иммунитета. В течение последнего десятилетия всесторонне анализируется субпопуляция CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов – Th17-клетки. В том числе появляются данные о том, что Th17-лимфоциты участвуют в защите макроорганизма от внутриклеточных патогенов, в частности *M. tuberculosis* [61, 233].

В настоящее время показано, что Th17-цитокины вносят существенный вклад в развитие иммунопатологических реакций, формирующихся при туберкулезе легких. Так, IL-17A, оказывая провоспалительное действие, инициирует воспаление, особенно в легких. Имеются данные, что повышение секреции IL-17A Th17-лимфоцитами в ответ на стимуляцию IL-23 приводит к значительному снижению числа *M. tuberculosis* в легких [154].

Основную роль IL-17A играет в процессах формирования и поддержания структуры гранулемы. Туберкулезная гранулема формируется в ответ на микобактериальную инфекцию в легких и является важным компонентом иммунной защиты. Активные гранулемы содержат организованные лимфоидные структуры (*inducible Bronchus Associated Lymphoid Tissue*, iBALT), формирование которых опосредовано хемокином CXCL13. Данный хемокин секретируется дендритными клетками и фибробластами, находящимися в пределах лимфоидных фолликулов гранулемы, и представляет собой мощный хемотаксический фактор для макрофагов, Т- и В-лимфоцитов через их поверхностный рецептор CXCR5. Экспрессия легочного CXCL13 и формирование iBALT в данном случае контролируется IL-17A/F и IL-23. Дефицит IL-23, а следовательно и IL-17, приводит к снижению экспрессии CXCL13 в лимфоидных фолликулах. В свою очередь, недостаток хемотаксического фактора снижает способность иммунокомпетентных клеток мигрировать из циркуляторного русла в очаг воспаления. Способностью стимулировать секрецию CXCL13 обладает и IL-22 [141, 160]. Кроме того, IL-17 стимулирует в лимфоидных В-клеточных фолликулах продукцию опсонизирующих антител IgG2a и IgG3, способствующих склеиванию *M. tuberculosis*, облегчая последующий их фагоцитоз макрофагами [141, 213].

Участие IL-17 в поддержании структуры гранулемы осуществляется также путем привлечения и ограничения гибели нейтрофилов [18, 61, 64, 85, 132, 139]. Показано, что IL-17A и F способны стимулировать фибробласты и эпителиальные клетки в легких, индуцируя экспрессию данными клетками факторов миграции и выживания нейтрофилов, таких как IL-8 и G-CSF. Выявлена также способность

IL-17 стимулировать гранулоцитопоез в красном костном мозге и селезенке [256]. Кроме того, IL-17A и F поддерживают миграцию в легкие и ключевых эффекторных клеток – Th1-лимфоцитов через продукцию хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11. В гранулемах Th17-цитокينات стимулируют секрецию IFN $\gamma$  Th1-лимфоцитами и NK-клетками [91, 132, 139].

Таким образом, IL-17 является важным цитокином в индукции Th1-иммунного ответа и развития протективного иммунитета против *M. tuberculosis*. В данном случае IL-17 также наиболее полно реализует свои эффекты, действуя в комплексе с IL-23. В экспериментах на мышах доказано, что при инфицировании животных BCG IL-23 стимулирует Th17-лимфоциты к высокой продукции IL-17. В этой же BCG-модели установлено, что отсутствие IL-17 в очаге воспаления приводит к снижению инфильтрации легких моно- и полиморфно-ядерными клетками [132]. В других исследованиях показано, что сочетанное действие IL-17 и IL-23 способствует накоплению макрофагов в очаге воспаления, вызванном IL-23, и баланс между IL-12/IFN- $\gamma$  и IL-23/IL-17 имеет решающее значение в регуляции силы воспалительных реакций [99, 110, 177].

Совместно с данными о положительном влиянии IL-17 на течение туберкулезной инфекции имеются сведения и о негативных его эффектах. Так, имеются данные, что высокий уровень цитокина формирует воспаление гиперергического типа с выраженной нейтрофильной инфильтрацией и повреждением легочной ткани [212]. Учитывая столь противоречивые данные, исследование уровня IL-17-продукции Th17-лимфоцитами при ТЛ является важным и актуальным.

В ряде зарубежных работ описано, что IL-22, наряду с IL-17, также вносит свой вклад в защиту человека от микобактериальной инфекции [91, 166]. Однако в отличие от IL-17, роль IL-22 при ТЛ недостаточно изучена [68, 187]. Тем не менее, на сегодняшний день показано, что IL-22 способен ограничивать внутриклеточный рост *M. tuberculosis in vitro*, что дает предпосылки для изучения активности цитокина *in vivo* [187]. Кроме того, как указывалось ранее, IL-22 способствует секреции антимикробных пептидов, таких как  $\beta$ -дефензин 2 и

провоспалительных молекул, принадлежащих к семейству S100 кальций-связывающих белков, принимающих активное участие в защите организма от внутриклеточных бактерий [163, 136, 170].

Важные исследования для понимания роли IL-22 в иммунопатогенезе ТЛ проведены R. Dhiman и соавторами. Известно, что одним из главных свойств патогенности возбудителя туберкулеза является способность выживать и размножаться внутри мононуклеарных фагоцитов за счет предотвращения образования фаголизосом, в которых микроорганизмы разрушаются. Авторами показано, что IL-22, секретируемый Th17-лимфоцитами и NK-клетками, способен ингибировать внутриклеточный рост *M. tuberculosis* посредством усиления фаголизосомального слияния [137, 169, 203]. Считается, что ключевыми цитокинами в борьбе с внутриклеточными патогенами являются TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  [137]. Данные цитокины также секретируются Th17-клетками, но в менее значимых количествах, чем IL-22. Показано, что IL-22 способствует фаголизосомальному слиянию за счет усиления экспрессии абсолютно необходимых для этого молекул: эндосомального маркера Rab7 и кальций-связывающего белка кальгранулина A. Параллельно IL-22 ингибирует экспрессию белка Rab14, блокирующего фагосомальное созревание [169].

Кроме того, имеются литературные данные, что при туберкулезной инфекции важна tandemная активность IL-22 и IL-17. Тогда как IL-17 индуцирует локальную продукцию хемокинов в легких для привлечения в очаг Т-клеток, IL-22 в свою очередь ингибирует экспансию иммуносупрессорных Treg, усиливая антиген-специфический Т-клеточный ответ [139, 169, 203]. Однако механизм, посредством которого IL-22 ингибирует экспансию Treg, на сегодняшний день неизвестен [203].

В исследованиях T.S. Scriba и соавторов установлено, что у пациентов с ТЛ в периферической крови отмечается снижение числа IL-17- и IL-22-продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с показателями у здоровых добровольцев, тогда как в бронхоальвеолярном лаваже, напротив, регистрируется повышение концентрации IL-22. Интересным является тот факт, что IL-17 в

бронхоальвеолярном лаваже отсутствует. По мнению авторов, это может быть обусловлено супрессорным действием Th1-цитокинов, поскольку при добавлении IFN- $\gamma$  в культуру мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных ТЛ происходило угнетение продукции IL-17, тогда как секреция IL-22 оставалась неизменной [91].

Исследований, касающихся участия IL-26 в микобактериальной защите организма человека, на сегодняшний день также очень мало. Выдвигались предположения, что IL-26 выступает в качестве индуктора АПК, опосредующего секрецию данными клетками цитокинов, ответственных за реализацию Th1-иммунного ответа. Однако J.M. Guerra-Laso и его коллеги опровергли это предположение [190]. Они показали, что добавление IL-26 в культуру мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови больных ТЛ, не влияет на уровень продукции ими IL-12 и TNF- $\alpha$ . Кроме того, имеются данные, что IL-26, секретируемый мононуклеарными лейкоцитами, способствует мобилизации и накоплению в легких нейтрофилов, то есть выступает в качестве хемоаттрактанта для нейтрофильных гранулоцитов [172]. Однако в другом исследовании доказано, что ген, кодирующий IL-20R1 субъединицу IL-26R, не экспрессируется в нейтрофилах. Из гематопоетических клеток полноценный рецептор для IL-26 на данный момент обнаружен только на лимфоцитах. Объяснением такого парадокса может быть лишь тот факт, что биологическая активность IL-26 опосредована не только через его рецептор [190].

В том же опыте [190] изучена экспрессия гена *IL26* в моноцитах больных ТЛ. Результаты исследования показали, что экспрессия *IL26* в клетках пациентов с туберкулезной инфекцией ниже, чем у здоровых доноров. Далее авторы провели исследования с цельной кровью *in vitro* и по результатам предположили, что IL-26 оказывает супрессорное влияние на иммунный ответ против *M. tuberculosis*. Смысл опыта заключался в инкубировании цельной крови от больных туберкулезной инфекцией с добавлением IL-26 и без него. Результат оценивался по количеству живых *M. tuberculosis* после инкубации. Учитывая, что полноценный IL-26R экспрессируется в больших количествах на лимфоцитах,



вывод эксперимента заключался в том, что ингибирующий эффект IL-26 на иммунный ответ может быть связан с негативным влиянием на взаимодействие между лимфоцитами и фагоцитами. Иммуносупрессорное влияние цитокина на противотуберкулезный иммунитет подтверждало и снижение продукции IL-2 мононуклеарными клетками *in vitro* после стимуляции рекомбинантным IL-26.

С другой стороны, IL-26, секретируемый Th17-лимфоцитами, является позитивным регулятором клеток-продуцентов. Стимулируя моноциты, IL-26 запускает синтез и продукцию последними провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  и IL-6 и хемокинов (главным образом CCL20), которые, в свою очередь, участвуют в генерации ROR $\gamma$ t-позитивных Т-клеток. Далее IL-26 усиливает продукцию зрелыми Th17 ключевых цитокинов данной клеточной субпопуляции – IL-17A и IL-22 [143, 256].

Еще меньше в современной литературе информации о роли в противотуберкулезном иммунитете IL-21 и CCL20. Существует мнение, что IL-21 ингибирует дифференцировку Th1-лимфоцитов и, следовательно, негативно влияет на продукцию IFN- $\gamma$ . С другой стороны, цитокин выступает важным фактором для роста для CD8<sup>+</sup> Т-клеток и способствует дифференцировке Th0 по Th17-пути, усиливая продукцию последними IL-17 [94, 135]. Ранее считалось, что комбинация TGF- $\beta$  и IL-6 является решающей для формирования субпопуляции Th17-лимфоцитов и что IL-6-дефицитные клетки не способны дифференцироваться в этом направлении. На сегодняшний день доказано, что стимуляция даже IL-6-дефицитных клеток IL-21 в комбинации с TGF- $\beta$  генерирует формирование пула Th17, подчеркивая первостепенную важность IL-21. О влиянии IL-21 на течение иммунного ответа против *M. tuberculosis* можно судить лишь в аспекте усиления продукции Th17-лимфоцитами IL-17, поскольку IL-21 напрямую стимулирует экспрессию IL-17-кодирующих генов [133].

В крови пациентов с ТЛ отмечается увеличение концентрации CCL20. Данный факт играет важное значение в привлечении нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов/макрофагов и дендритных клеток в зону воспаления, в том числе в гранулему [100].

Несмотря на очевидное участие Th17-цитокинов в реализации воспалительных реакций, их роль в патогенезе инфекционных заболеваний, в том числе туберкулеза, в настоящее время полностью не определена. В свете указанных выше данных, понимание роли Th17-лимфоцитов и секретируемых ими цитокинов в развитии иммунопатологических реакций при ТЛ позволит расшифровать новые механизмы реагирования иммунной системы на инфицирование *M. tuberculosis*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объект исследования

В основу настоящего исследования положены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 117 больных (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 туберкулезом легких (ТЛ). Возрастно-половая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Возрастно-половая характеристика пациентов с туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	В зависимости от устойчивости <i>M. tuberculosis</i>	Пол пациента	Число обследованных лиц		Средний возраст, $X \pm m$
			Абс.	%	
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких	Лекарственно-чувствительный	Мужчины	37	31,6	$39,0 \pm 8,6$
		Женщины	10	8,6	
	Лекарственно-устойчивый	Мужчины	15	12,8	$39,8 \pm 8,7$
		Женщины	4	3,4	
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких	Лекарственно-чувствительный	Мужчины	24	20,5	$39,5 \pm 10,8$
		Женщины	7	6,0	
	Лекарственно-устойчивый	Мужчины	16	13,7	$43,2 \pm 6,7$
		Женщины	4	3,4	

Все пациенты были госпитализированы во фтизиатерпевтическое отделение № 1 Томской областной клинической туберкулезной больницы (в н.в. – ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр») (главный врач – Е.А. Крук) из учреждений общей лечебной сети г. Томска и Томской области. От всех пациентов было получено согласие на участие в исследовании, о ходе и целях которого они были проинформированы. Исследования проводились по разрешению локального этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (№ 2870 от 27.11.2011)

Сбор анамнеза, клинический осмотр пациентов, физикальные методы обследования больных, постановку диагноза и назначение соответствующих схем лечения осуществляли врачи-фтизиатры Томской областной клинической

туберкулезной больницы: канд. мед. наук Л.Е. Петрова, канд. мед. наук О.В. Анастасов, А.А. Платоненкова, Е.П. Степанова, О.И. Новосельцева.

Все больные ТЛ были разделены на две основные группы в зависимости от клинической формы заболевания: с диссеминированным и инфильтративным ТЛ. В зависимости от чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) к противотуберкулезным средствам (ПТС) каждая из этих групп больных была дополнительно разделена на две подгруппы: с лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым ТЛ (рисунок 2).

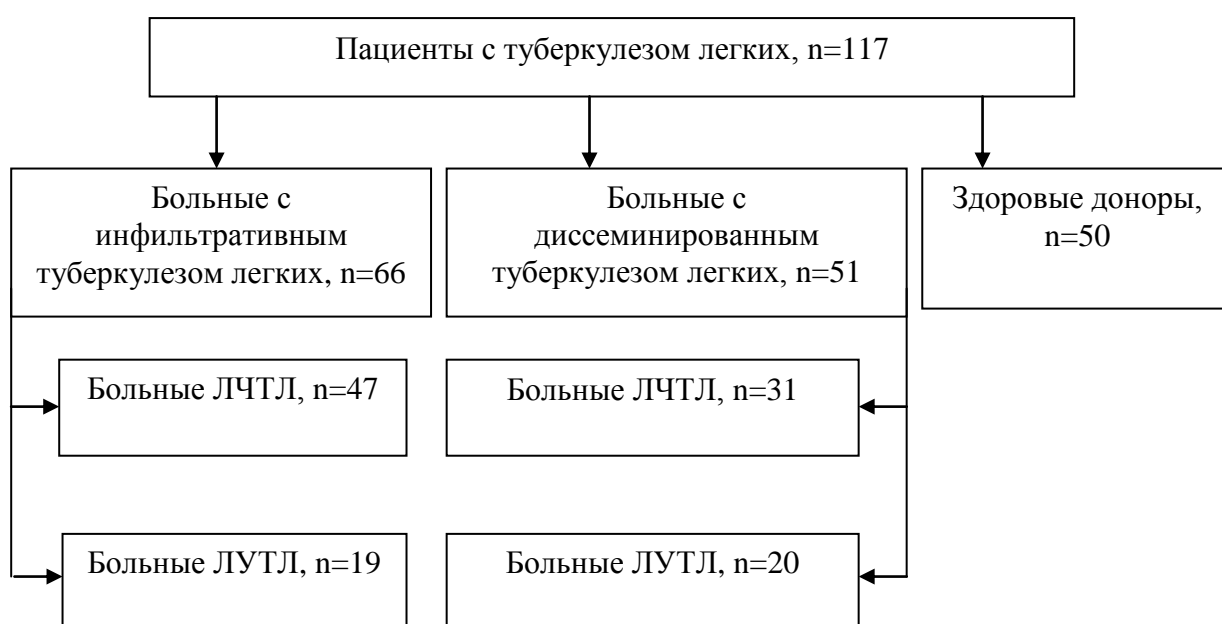


Рисунок 2 – Схема распределения обследуемых лиц по группам

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

Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты, полученных на базе лабораторий Томской областной клинической туберкулезной больницы.

Клиническая картина заболевания характеризовалась признаками астеновегетативного синдрома (слабость, субфебрильная температура тела, ночные поты, повышенная утомляемость, снижение или отсутствие аппетита, потеря массы тела, тахикардия) и бронхолегочных симптомов (кашель, одышка,

выделение мокроты, кровохарканье, боль в грудной клетке, связанная с дыханием).

Из 117 пациентов диагноз инфильтративного ТЛ был поставлен 66 (56,41%) больным, диагноз диссеминированного ТЛ – 51 (43,59%) больному. У 106 пациентов (90,60%) поражение легочной ткани характеризовалось вовлечением в патологический процесс обоих легких. Все исследования проводились однократно до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии.

Наличие *M. tuberculosis* в мокроте обследуемых лиц устанавливали методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флюорохромов (аурамина). Определение чувствительности возбудителя к ПТС осуществлялось путем посева мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2 (метод абсолютных концентраций). Бактериовыделение регистрировалось у 100% обследованных пациентов.

Критериями исключения больных ТЛ из исследования служили: возраст менее 20 или более 55 лет; проведение вакцинации/ревакцинации BCG (*Bacillus Calmette–Guerin*) в течение 3-х лет, предшествующих исследованию, и другими вакцинами; 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; отказ от исследования.

В контрольную группу вошло 50 человек (21 мужчина и 29 женщин) в возрасте от 20 до 55 лет (средний возраст  $37,9 \pm 6,8$ ). Условиями включения в группу сравнения здоровых доноров 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; отсутствие в

анамнезе инфекционных заболеваний в течение 3-х месяцев, предшествующих исследованию.

## **2.2 Материал исследования**

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

## **2.3 Методы исследования**

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

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования.

Венозную гепаринизированную кровь выдерживали в термостате при 37°C в течение 30-40 мин для отделения плазмы от эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности фиколла ( $\rho=1077 \text{ кг/м}^3$ ), предварительно добавленному в центрифужные пробирки в соотношении 1:2, и центрифугировали при 300 g в течение 20 мин. Полученное интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали с раздела фаз через верхний слой плазмы пипеткой и переносили в другую пробирку. Содержание моноцитов и лимфоцитов в клеточной суспензии составляло 10-20% и 80-90% соответственно. Смесь в новой пробирке дважды отмывали средой RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия), доводя объем до 10 мл, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз при 300 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли. Выделенные клетки вновь ресуспендировали в 1 мл раствора полной питательной среды, состоящей из 90%

RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина (ООО «БиолоТ», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия).

### 2.3.2 Подсчет количества лимфоцитов в клеточной суспензии и определение их жизнеспособности

Для подсчета клеток в полученной суспензии использовали стандартный гематологический метод.

*Принцип метода* заключается в подсчете количества лимфоцитов в счетной камере Горяева в определенном количестве квадрантов счетной сетки с пересчетом на 1 мл по системе СИ, исходя из объема квадрата (1/250 мкл) и разведения крови (в 20 раз) с помощью световой микроскопии.

*Ход работы.* Для подсчета лимфоцитов в пробирке смешивали 0,4 мл 3-5% раствора уксусной кислоты с 0,02 мл клеточной суспензии. Заполняли полученной смесью камеру Горяева и оставляли ее на 1 минуту в горизонтальном положении для оседания клеток. После чего помещали камеру на столик микроскопа и производили подсчет клеток в 100 больших квадратах по всей площади сетки. Расчет числа лимфоцитов осуществляли по формуле:

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

где X – количество лимфоцитов в 1 мл клеточной суспензии;

a – сумма лимфоцитов, подсчитанных в 100 больших квадратах.

Результаты выражали в абсолютных числах ( $\times 10^6/\text{мл}$ ). Стандартизировали количество клеток в суспензии до  $2,5 \times 10^6/\text{мл}$ .

Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест с трипановым синим. Для этого 0,1 мл клеточной суспензии смешивали с равным объемом 0,5% раствора трипанового синего («Serva», США), заполняли этой смесью счетную камеру, подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и «мертвых клеток» (окрашенных в синий цвет). Результаты выражали в процентах. Жизнеспособность клеток составляла не менее 95%.

### **2.3.3 Выделение моноцитов из взвеси моноклеарных лейкоцитов**

Выделение моноцитов из взвеси моноклеарных лейкоцитов осуществляли методом градиентного центрифугирования. К взвеси моноклеарных клеток добавляли стандартный изотонический раствор перколла (SIP), доводя объем в пробирке до 2,5 мл. Далее производили наслоение 5 мл 45% раствора SIP и 2 мл 25% раствора SIP, центрифугировали при 800 g и 4<sup>0</sup>C в течение 45 мин. После центрифугирования визуализировали два интерфазных кольца, из которых верхнее содержало фракцию моноцитов. Данное кольцо собирали с раздела фаз через верхний слой плазмы пипеткой и переносили в другую пробирку. Смесь в новой пробирке однократно отмывали средой RPMI-1640 путем ресуспендирования и последующего осаждения клеток центрифугированием при 300 g и комнатной температуре в течение 10 мин. Объем клеточной суспензии доводили до 1 мл полной питательной средой и осуществляли подсчет клеток стандартным гематологическим методом в камере Горяева. Жизнеспособность моноцитов оценивали тестом с трипановым синим (см. п. 2.3.2). Жизнеспособность выделенных клеток составляла более 95%.

### **2.3.4 Стимуляция моноклеарных лейкоцитов периферической крови**

Стимуляция цитокинсекретирующей активности моноклеарных лейкоцитов осуществлялась внесением в пробы вакцинного штамма BCG (ФГУП «НПО Микроген», Россия) в дозе 50 мкг/мл.

Клеточные суспензии инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 48 ч при температуре 37°C, после чего пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 300 g, супернатант собирали и использовали для количественного определения концентрации цитокинов.



### **2.3.5 Трансформация моноцитов периферической крови в дендритные клетки**

Дендритные клетки (ДК) трансформировали из моноцитов периферической крови, внося в ячейки планшета  $1 \times 10^6$  клеточной взвеси, содержащей моноциты, и добавляя 1 мл полной питательной среды. Планшет помещали на 1 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубатор (5%  $\text{CO}_2$ ) при  $37^\circ\text{C}$ , далее осуществляли замену полной питательной среды в объеме 1 мл и добавляли неспецифические стимуляторы в виде IL-4 и GM-CSF («Sigma», USA) в концентрации 20 нг/мл. На 3-й день культивирования в прежних условиях удаляли  $\frac{3}{4}$  среды и вновь вносили равное количество полной питательной среды с цитокинами-стимуляторами. В течение 2-3 дней в культуральной среде появлялись первые незрелые ДК. Моноциты утрачивали адгезионную способность к пластику, увеличивались в размере, из их монослоя формировались первые скопления клеток отростчатой формы. На 5-й день инкубации производили повторную замену полной питательной среды с добавлением стимулятора – липополисахарида – ЛПС («Sigma», USA) в концентрации 5 мг/мл. На 6-е сутки культивирования из моноцитов крови формировались зрелые дендритные клетки [1]. На 7-е сутки культивирования собирали супернатанты ДК для последующего измерения концентрации IL-23.

### **2.3.6 Анализ цитокинсекреторной активности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови и трансформированных дендритных клеток *in vitro***

Для определения содержания интерлейкинов (IL) 17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-22, IL-23 в супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA).

*Принцип метода.* Концепция метода заключается в применении двух типов антител с различной эпитопной специфичностью к цитокину: один тип антител (мышинные моноклональные) иммобилизуется на твердой фазе, другой тип (кроличьи поликлональные, специфичные против цитокинов человека)

конъюгирован с ферментом.

На первой стадии анализа цитокин, присутствующий в калибровочных и исследуемых пробах, связывается с антителами, адсорбированными на внутренней поверхности лунок. На второй стадии анализа иммобилизированный цитокин взаимодействует с конъюгатом 1, содержащим поликлональные антитела, которые связываются с независимым эпитопом цитокина. Избыток кроличьих антител удаляется. На следующей стадии анализа к сорбированным на твердой фазе комплексам цитокин-антитела добавляется конъюгат 2, содержащий окрашивающий раствор и фермент. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически.

*Ход работы.* Процедуру выполнения иммуноферментного анализа (ИФА) проводили согласно инструкциям, предлагаемым фирмами-производителями используемых тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия; «R&D Systems», США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли на фотометре «Multiscan EX» («Thermo», Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи пакета программ «Multiscan Magic». Концентрацию анализируемых цитокинов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов цитокинов с известной концентрацией. Результаты представляли в пг/мл.

### **2.3.7 Определение иммунофенотипа Th17-лимфоцитов крови**

Для исследования экспрессии поверхностных рецепторных молекул CD4, CD161 и внутриклеточного IL-17A использовали метод проточной лазерной трехцветной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками. Окрашивание поверхностных (CD4, CD161) и внутриклеточного (IL-17A) маркеров осуществляли согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем («Becton Dickinson», США).

*Ход работы.* Полученную клеточную суспензию (см. п. 2.3.1)

стимулировали смесью, содержащую ФМА (форболмиристатацетат) и иономицин («Cell stimulation cocktail», «eBioscience», США), и добавляли ингибитор транспорта протеинов «BD Golgi Stop» (Protein transport inhibitor containing monensin; «Becton Dickinson», США). Культуру клеток инкубировали в течение 4 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C. По окончании инкубации пробы центрифугировали в течение 10 мин при 250 g, отмывали в 3-5 мл BD Cell WASH solution («Becton Dickinson», США). После этого отбирали объем клеточной суспензии, содержащей  $1 \times 10^6$  клеток, в пробирку для проточной цитометрии.

Следующим этапом работы было окрашивание поверхностного маркера лимфоцитов – CD161. Для этого к клеточной суспензии добавляли по 20 мкл специфических МКАТ, меченных флуоресцеином изотиоционатом (FITC) («Becton Dickinson», США). Инкубировали пробы в течение 30 мин при температуре 20-25°C в темном месте. Для окраски CD4 и IL-17A проводили процесс фиксации и пермеабилзации клеток. С этой целью в каждую пробирку добавляли 250 мкл холодного Fixation/Permeabilization solution («Becton Dickinson», США) и инкубировали в течение 20 мин при 4°C в защищенном от света месте. Далее клетки двукратно отмывали 1 мл BD Perm/Wash™ buffer («Becton Dickinson», США) с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 250 g. Осадок ресуспендировали и добавляли к нему по 20 мкл антител к CD4, меченные перидинин-хлорофилл протеином (PerCP), и к внутриклеточному IL-17A, меченные фикоэритрином (PE). Инкубировали 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После этого клетки дважды отмывали 1 мл BD Perm/Wash™ buffer («Becton Dickinson», США), центрифугируя по 5 мин при 250 g. К полученному осадку добавляли 300 мкл окрашивающего буфера («Stain Buffer», «Becton Dickinson», США). После проведения всех вышеуказанных процедур пробы были готовы к измерению на проточном цитофлуориметре.

Измерения проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur Flow cytometer BD» («Becton Dickinson», США), снабженном аргоновым лазером ( $\lambda=488$  нм) и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных

осуществляли при помощи программного приложения «BD Cell Quest for Mac OS® X».

Образцы клеточных суспензий анализировали по пяти параметрам: прямому светорассеянию (FSC), боковому светорассеянию (SSC), трем показателям флуоресценции – зеленой (FITC – 530 нм), оранжевой (PE – 585 нм) и малиновой (PerCP – 610 нм), выявляемых на FL1-, FL2-, FL3-каналах, где прямое светорассеяние характеризует размер клетки, боковое светорассеяние – цитоплазматические и мембранные особенности клетки (рисунки 3-5).

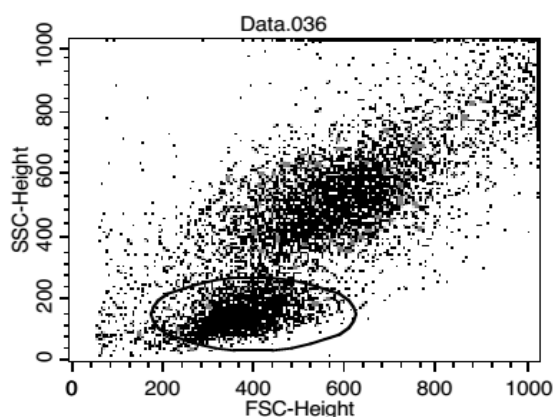


Рисунок 3 – Гистограмма распределения мононуклеарных лейкоцитов по интенсивности прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценка общего содержания лимфоцитов в смешанной суспензии мононуклеарных лейкоцитов.

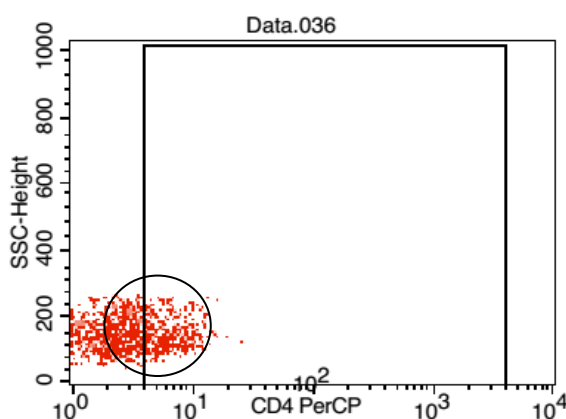


Рисунок 4 – Гистограмма распределения меченных PerCP CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов по интенсивности SSC-светорассеяния и флуоресценции по первому каналу FL1.

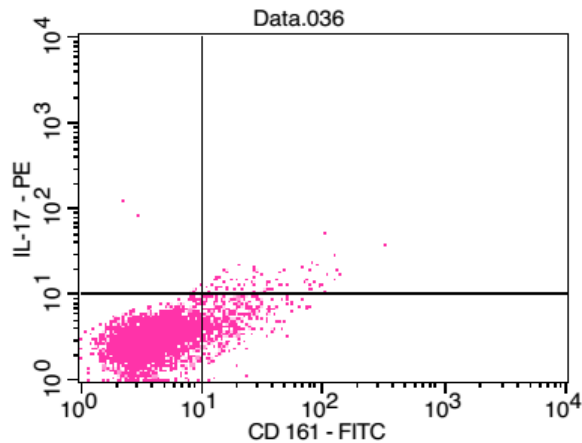


Рисунок 5 – Гистограмма распределения  $CD161^+IL-17A^+$  Т-лимфоцитов в популяции CD4-позитивных лимфоцитов крови по интенсивности флуоресценции в FL2-, FL3-каналах (правый верхний квадрант). Используются метки FITC и PE.

В исследовании применяли изотипический контроль МКАТ (мышинный IgG1), меченных FITC, PerCP и PE («Becton Dickinson», США), позволяющий идентифицировать границы неспецифического связывания рецепторов клеток образца со специфическими антителами. По данным исследования изотипического контроля устанавливали квадранты гейтирования.

## 2.4 Статистический анализ результатов

Статистический анализ полученных результатов исследования проводили на основе общепринятых статистических методов с использованием пакета программ «Statistica for Windows» (Version 10.0) фирмы «Stat SoftInc.» и «Microsoft Excel» (2010) корпорации «Microsoft». Проверку гипотезы о нормальном законе распределения количественных показателей проводили 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 Т-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) [2, 40].

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Содержание $CD4^+CD161^+IL-17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких

##### 3.1.1 Содержание $CD4^+CD161^+IL-17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

В ходе проведенного исследования у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких (ТЛ) в острый период заболевания установлено повышение относительного и абсолютного числа  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в крови по сравнению с показателями у здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). У больных диссеминированным ТЛ исследуемый показатель статистически достоверно не отличался от значения в группе контроля, однако был ниже такового у пациентов с инфильтративным ТЛ (таблица 2).

Таблица 2 – Количество  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, 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	$\frac{1,41 (0,79-2,72)}{0,032 (0,013-0,056)}$
Больные инфильтративным туберкулезом легких	$\frac{4,28 (1,89-5,58)}{0,082 (0,051-0,173)}$ $p_1 < 0,001$
Больные диссеминированным туберкулезом легких	$\frac{2,40 (0,85-3,30)}{0,043 (0,014-0,061)}$ $p_2 = 0,023$ $p_2 = 0,009$

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

### 3.1.2. Содержание $CD4^+CD161^+IL-17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным средствам

При исследовании количества (относительного и абсолютного)  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам (ПТС) выявлено его увеличение ( $p < 0,05$ ) во всех группах больных, исключая пациентов с диссеминированным лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТЛ, где количество анализируемых клеток не отличалось от нормы (таблица 3).

Кроме того, процентное и абсолютное содержание  $CD4^+CD161^+IL17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ оказалось выше, чем при лекарственно-чувствительном (ЛЧ) варианте инфекции. В случае диссеминированного ЛУТЛ аналогичная картина изменений отмечалась только в отношении процентного содержания клеток. При этом количество  $CD4^+CD161^+IL17A^+$  Th17-лимфоцитов при инфильтративном ЛУТЛ оказалось выше, чем при ЛУ-варианте диссеминированного ТЛ (таблица 3).

Таблица 3 – Количество  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам, Ме ( $Q_1 - Q_3$ )

Группы обследованных лиц	$CD4^+CD161^+IL17A^+$ Th17-лимфоциты
	(в числителе – в %, в знаменателе – в абсолютных числах, $\times 10^9/л$ )
1	2
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) $p_1=0,026$



Продолжение таблицы 3

1	2
Больные инфильтративным ЛУТЛ	$5,60 (2,38-10,49)$ $p_1 < 0,001; p_4 = 0,003$ <hr/> $0,123 (0,051-0,409)$ $p_1 < 0,001; p_4 = 0,005$
Больные диссеминированным ЛЧТЛ	$3,07 (2,75-5,06)$ $p_1 = 0,008$ <hr/> $0,061 (0,039-0,088)$ $p_1 = 0,015$
Больные диссеминированным ЛУТЛ	$1,43 (0,68-2,39)$ $p_2 = 0,002; p_4 = 0,046$ <hr/> $0,028 (0,009-0,037)$ $p_2 < 0,001$

*Примечание* – ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких;  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_4$  – у больных с ЛЧТЛ.

### **3.2 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких**

#### **3.2.1 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания**

В разгар заболевания у больных с инфильтративным и диссеминированным ТЛ зарегистрировано увеличение базальной (в 1,5 и 3,2 раза ( $p < 0,05$ )) и BCG-стимулированной (в 1,3 и 2,8 раза ( $p < 0,05$ )) секреции IL-17A *in vitro* относительно группы здоровых добровольцев. Наиболее выраженные изменения секреции цитокина *in vitro* отмечались у больных с диссеминированной формой заболевания (таблица 4).

Что касается IL-22, то при обеих клинических формах ТЛ также устанавливалось статистически значимое увеличение базальной секреции цитокина относительно контрольных значений более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ). BCG-

индуцированная секреция IL-22 у больных ТЛ была сопоставимой с таковой в группе здоровых доноров (таблица 4).

Наряду с этим, BCG-стимуляция *in vitro* способствовала повышению секреции IL-17 и IL-22 в сравнении с базальной секрецией цитокинов только у здоровых доноров (таблица 4).

Таблица 4 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Ме (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>)

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 <sub>3</sub> =0,01	14,48 (10,09-33,68)	60,77 (41,75-73,58) p <sub>3</sub> =0,04
Больные инфильтративным туберкулезом легких	30,59 (24,38-46,16) p <sub>1</sub> =0,002	34,21 (26,82-49,89) p <sub>1</sub> =0,045	35,93 (20,61-55,84) p <sub>1</sub> =0,030	62,47 (34,69-112,35)
Больные диссеминированным туберкулезом легких	65,39 (54,09-209,10) p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,002	75,57 (56,65-292,90) p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> =0,007	41,38 (30,01-50,43) p <sub>1</sub> =0,032	46,71 (19,44-52,25)

Примечание – p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – у больных с инфильтративным туберкулезом легких; p<sub>3</sub> – с показателями базальной секреции.

### 3.2.2 Секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным средствам

Анализ цитокинсекреторной активности с учетом чувствительности возбудителя заболевания к лекарственным средствам этиотропной терапии позволил установить, что у всех больных ЛЧТЛ и ЛУТЛ (независимо от

клинической формы) отмечалось повышение базальной секреции IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro* по сравнению с соответствующими параметрами в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). При этом только уровень IL-17A в культуральных супернатантах у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ оказался значительно выше ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов с ЛУ-вариантом инфильтративного ТЛ (таблица 5).

После инкубации клеток с вакцинным штаммом BCG повышение секреции IL-17A (по сравнению с контрольными значениями) отмечалось у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ и ЛУТЛ и при инфильтративном ЛЧТЛ, а увеличение показателей секреции IL-22 – только у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ ( $p < 0,05$ ). В данном случае BCG-индуцированная секреция IL-17A *in vitro* при диссеминированном ЛУТЛ была в 8,9 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем при инфильтративном ЛУТЛ, а секреция IL-22 при инфильтративном ЛЧТЛ оказалась в 4,7 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем при диссеминированном ЛЧТЛ. Важно отметить, что при BCG-индукции клеток прирост продукции IL-17A и IL-22 в сравнении с базальной секрецией цитокинов отмечался только в группе здоровых доноров и у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ (таблица 5).

Таблица 5 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-17A и IL-22 мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у здоровых доноров и больных туберкулезом легких с учетом лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, Me ( $Q_1 - Q_3$ )

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
1	2	3	4	5
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) $p_3=0,04$

Продолжение таблицы 5

1		2	3	4	5
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* –  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – с показателями базальной секреции.

Для определения взаимосвязи между количеством  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови и концентрацией цитокинов IL-17A и IL-22 в супернатантах культуральных суспензий был проведен корреляционный анализ (рисунки 6, 7), который выявил наличие средней положительной взаимосвязи между анализируемыми параметрами ( $r=0,56$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,50$ ,  $p<0,05$  соответственно).

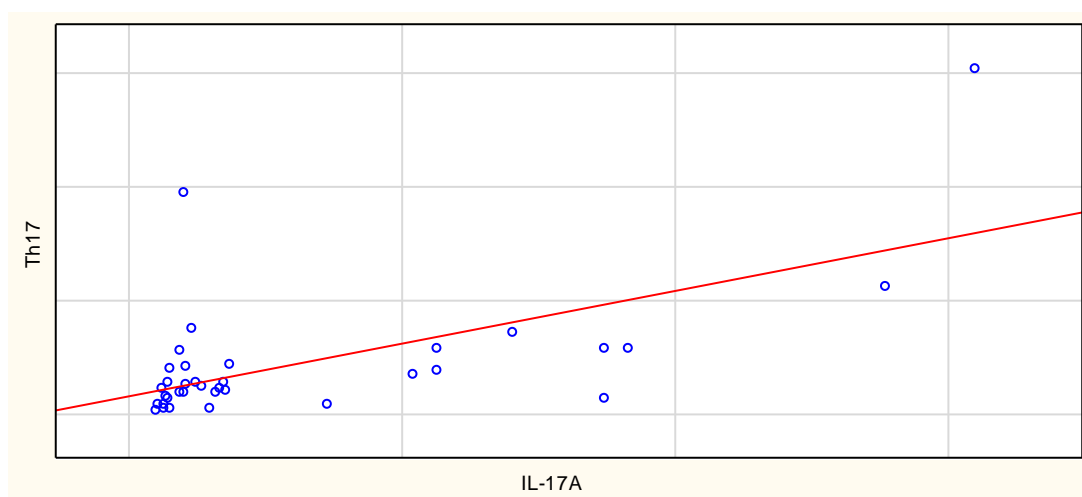


Рисунок 6 – Диаграмма рассеяния для показателей со статистически значимой слабой положительной линейной взаимосвязью ( $r=0,56$ ,  $p<0,05$ ): количество  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов ( $\times 10^9/л$ ) и концентрация IL-17A (пг/мл).

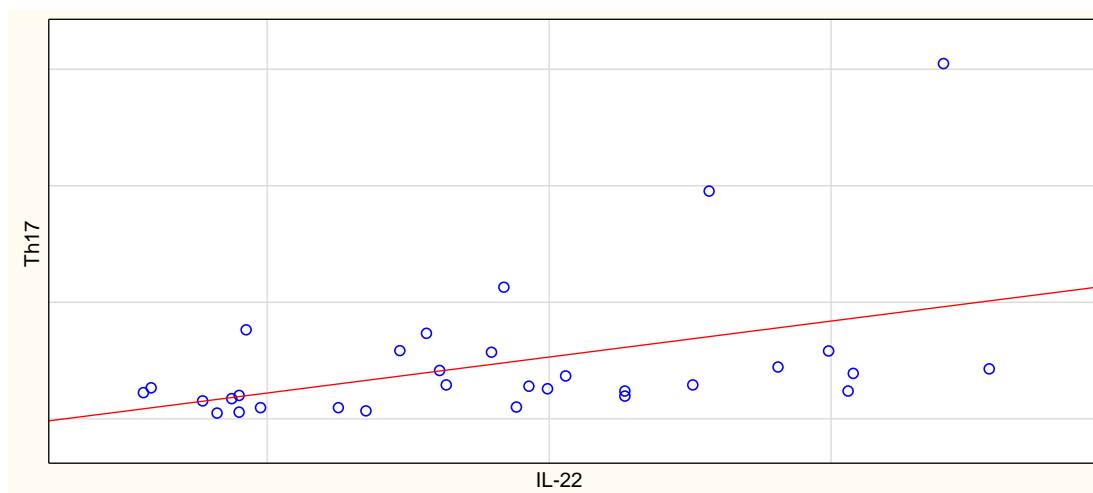


Рисунок 7 – Диаграмма рассеяния для показателей со статистически значимой слабой положительной линейной взаимосвязью ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ): количество  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов ( $\times 10^9/л$ ) и концентрация IL-22 (пг/мл).

### 3.3 Секреция IL-1 $\beta$ , IL-6 и TGF- $\beta$ мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких

#### 3.3.1 Секреция IL-1 $\beta$ , IL-6 и TGF- $\beta$ мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

Результаты проведенного исследования показали, что у больных с ТЛ независимо от клинической ее формы по сравнению с нормой изменений

содержания IL-1 $\beta$  в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови, как без BCG, так и с его добавлением, не отмечалось (таблица 6).

Таблица 6 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-1 $\beta$ , IL-6 и TGF- $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц		Здоровые доноры	Больные инфильтративным туберкулезом легких	Больные диссеминированным туберкулезом легких
Концентрация IL-1 $\beta$ , пг/мл	Базальная секреция	326,15 (305,20-357,10)	342,40 (325,30-365,60)	329,45 (319,40-395,40)
	BCG-индуцированная секреция	330,80 (319,30-361,80)	339,20 (321,80-355,50)	336,20 (322,60-347,60)
Концентрация IL-6, пг/мл	Базальная секреция	218,70 (143,80-281,10)	281,10 (267,60-291,80) $p_1=0,027$	297,15 (241,40-332,00) $p_1=0,009$ $p_2=0,016$
	BCG-индуцированная секреция	220,50 (142,20-266,50)	268,45 (225,80-280,10) $p_3=0,027$	285,70 (251,10-366,00)
Концентрация TGF- $\beta$ , пг/мл	Базальная секреция	934,20 (746,60-1487,20)	902,30 (500,9-1096,83)	1427,19 (991,20-1897,53) $p_1=0,049$ $p_2=0,001$
	BCG-индуцированная секреция	1087,80 (764,10-1242,66)	950,20 (462,01-1292,00)	912,12 (734,50-1823,70) $p_3=0,047$

Примечание –  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных с инфильтративным туберкулезом легких;  $p_3$  – с показателями базальной секреции.

Базальная секреция IL-6, напротив, увеличивалась ( $p<0,05$ ) у пациентов как с инфильтративным, так и с диссеминированным ТЛ (в 1,3 и 1,4 раза соответственно) с наибольшей выраженностью в случае диссеминированной формы заболевания. При этом BCG-индуцированная секреция IL-6 оставалась в

пределах контрольных значений, однако в случае инфильтративного ТЛ была ниже ( $p < 0,05$ ) спонтанной секреции цитокина (таблица 6).

Характеризуя секрецию мононуклеарными лейкоцитами TGF- $\beta$ , следует отметить, что значимые различия отмечались только в случае диссеминированной формы заболевания, а именно увеличение базальной секреции TGF- $\beta$  в данной группе пациентов по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе и в группе пациентов с инфильтративным ТЛ. При этом BCG-индукция мононуклеарных лейкоцитов у больных диссеминированным ТЛ сопровождалась снижением секреции цитокина по сравнению с уровнем базальной его секреции (таблица 6).

### **3.3.2 Секреция IL-1 $\beta$ , IL-6 и TGF- $\beta$ мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным средствам**

В ходе исследования показано, что базальная и BCG-индуцированная секреция IL-1 $\beta$  в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов крови оставалась в пределах контрольных значений независимо от клинической формы заболевания и варианта чувствительности *M. tuberculosis* к лекарственным средствам этиотропной терапии (таблица 7).

Анализ секреции IL-6 *in vitro* выявил увеличение базальной секреции цитокина у пациентов с инфильтративным ТЛ независимо от варианта лекарственной чувствительности возбудителя, а также у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ в среднем в 1,3 раза относительно значения аналогичного показателя у здоровых добровольцев. Уровень BCG-индуцированной секреции IL-6 увеличивался лишь у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ (таблица 7).

Таблица 7 – Базальная и BCG-индуцированная секреция IL-1 $\beta$  и IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких с учетом лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц		Концентрация IL-1 $\beta$ , пг/мл		Концентрация IL-6, пг/мл		Концентрация TGF- $\beta$ , 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 <sub>1</sub> =0,023	275,10 (267,60-281,90) p <sub>1</sub> =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 <sub>1</sub> =0,041	254,80 (223,50-269,30)	748,80 (315,29-986,70) p <sub>1</sub> =0,046 p <sub>4</sub> =0,044	621,72 (195,32-838,20) p <sub>1</sub> =0,050 p <sub>4</sub> =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 <sub>1</sub> =0,031	273,70 (238,95-363,85)	1209,19 (935,81-1473,50)	783,21 (570,10-1100,06) p <sub>2</sub> =0,039 p <sub>3</sub> =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 <sub>1</sub> =0,015 p <sub>2</sub> =0,001	1823,70 (835,53-2825,20) p <sub>2</sub> =0,013 p <sub>4</sub> =0,028

Примечание – ТЛ – туберкулез легких; ЛЧ – лекарственно-чувствительный; ЛУ – лекарственно-устойчивый; p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – у больных с инфильтративным туберкулезом легких; p<sub>3</sub> – с показателями базальной секреции; p<sub>4</sub> – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких (внутри одной клинической формы).

Кроме того, у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ регистрировалось снижение как базальной, так и BCG-индуцированной секреции TGF- $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* по сравнению со здоровыми донорами и



больными инфильтративным ЛЧТЛ, в то время как при диссеминированном ЛУТЛ, напротив, отмечалось увеличение базальной секреции цитокина по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с инфильтративным ЛУТЛ в 1,9 и 2,3 раза соответственно. При этом уровень BCG-индуцированной секреции TGF- $\beta$  у больных диссеминированным ЛЧТЛ оказался значимо ниже базальной секреции цитокина; в остальных группах обследуемых базальная и антиген-индуцированная секреция TGF- $\beta$  существенно не различались (таблица 7).

Для установления взаимосвязи показателей секреции *in vitro* цитокинов, активирующих дифференцировку и функции Th17-лимфоцитов, с количеством и показателями цитокинсекреторной активности Th17-клеток был проведен корреляционный анализ. В результате данного анализа выявлена положительная взаимосвязь средней силы между содержанием CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови и IL-6 в супернатантах культуральных суспензий ( $r=0,61$ ,  $p<0,05$ ) и, напротив, отрицательная взаимосвязь средней силы между количеством CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-клеток и показателем секреции *in vitro* TGF- $\beta$  ( $r=-0,55$ ,  $p<0,05$ ). Кроме того, обнаружено наличие положительной взаимосвязи средней силы между показателями секреции IL-6 и IL-17A ( $r=0,51$ ,  $p<0,05$ ), а также слабой отрицательной взаимосвязи между показателями секреции TGF- $\beta$  и IL-17A ( $r=-0,39$ ,  $p<0,05$ ). Также выявлены слабые положительная и отрицательная взаимосвязи между показателем секреции IL-22 *in vitro* и концентрацией IL-6 ( $r=0,26$ ,  $p<0,05$ ) и TGF- $\beta$  ( $r=-0,12$ ,  $p<0,05$ ) в культуральных супернатантах.

### **3.4 Секреция IL-23 дендритными клетками *in vitro* у больных туберкулезом легких**

Данные, полученные в ходе определения концентрации IL-23 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток крови у больных ТЛ, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Концентрация IL-23 в супернатантах культуральных суспензий дендритных клеток у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Группы обследованных лиц	Концентрация IL-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)

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

Как видно из представленных в таблице 8 данных, во всех обследованных группах больных ТЛ, независимо от клинической формы и варианта заболевания (ЛЧТЛ или ЛУТЛ), уровень секреции IL-23 дендритными клетками *in vitro* сохранялся в пределах нормы.

Таким образом, согласно полученным результатам можно заключить, что у больных ТЛ регистрируется гиперсекреция IL-17A мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* как в спонтанных условиях, так и в условиях индукции клеток вакцинным штаммом BCG (исключая группу пациентов с инфильтративным ЛУТЛ). Максимальные значения секреции IL-17A отмечаются при диссеминированном ЛУТЛ. Секреция IL-22 в культуре мононуклеарных

лейкоцитов крови усиливается лишь в спонтанных условиях. При этом количество  $CD4^{+}CD161^{+}IL17A^{+}$  Th17-лимфоцитов крови, секретирующих данные цитокины, повышается во всех обследуемых группах пациентов, кроме группы больных с диссеминированным ЛУТЛ, у которых оно сохраняется в пределах нормы. Наряду с этим, при ТЛ отмечается увеличение секреции IL-6 *in vitro* – базальной и BCG-индуцированной у пациентов с инфильтративным ЛЧТЛ и базальной у пациентов с диссеминированным ЛУТЛ. У больных с диссеминированным ЛУТЛ базальная секреция TGF- $\beta$  увеличивается, тогда как у пациентов с инфильтративным ЛУТЛ базальная и BCG-индуцированная секреция данного цитокина, напротив, снижается. Уровень секреции IL-1 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови и IL-23 дендритными клетками при ТЛ сохраняется в пределах нормы.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно современным представлениям туберкулез легких (ТЛ) принадлежит к категории иммунозависимых заболеваний и характеризуется дисрегуляцией иммунных процессов на различных этапах формирования специфической противотуберкулезной защиты. На сегодняшний день накоплен большой массив данных о нарушениях основных этапов иммунного ответа макроорганизма на инфицирование *M. tuberculosis*, включая этапы распознавания и поглощения патогена фагоцитами, передачи антигенного сигнала Th1-лимфоцитам и осуществления ими функций, направленных на вовлечение в механизмы противоинфекционной защиты эффекторных клеток – лимфоцитов (в том числе натуральных киллеров и NKT-клеток), макрофагов и нейтрофилов [46, 69, 93]. Тем не менее, изучение и анализ каждого из этапов противотуберкулезного иммунного ответа создает все больше предпосылок для новых вопросов, чем ответов. Таким образом, исследования в данной области по-прежнему остаются востребованными и чрезвычайно актуальными для современной медицинской науки.

Особый интерес ученых, занимающихся исследованиями противотуберкулезного иммунитета, направлен на изучение активности фагоцитов (макрофагов и дендритных клеток) и, главным образом, Th1-лимфоцитов, как основных регуляторных клеток в борьбе с патогеном. Вместе с тем в формировании эффективной противотуберкулезной защиты следует учитывать и другие Т-клеточные субпопуляции, которые могут являться активными участниками антиген-специфического иммунного ответа, реализующегося на уровне системных иммунологических реакций и в ткани легких. В течение последних лет большое внимание исследователей привлекает Th17-субпопуляция CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, которая принимает участие в развитии протективного иммунного ответа против внутриклеточных патогенов, в том числе и *M. tuberculosis* [91, 122, 123, 139, 175, 178, 245, 259, 265]. Вместе с тем учитывая важность Th1-ответа в противотуберкулезном иммунитете, а также

потенциальные возможности вклада Th17-лимфоцитов в его реализацию, совместная индукция Th1- и Th17-субпопуляций лимфоцитов была бы оптимальной для защиты человека против туберкулезной инфекции. В недавних исследованиях был обнаружен интересный факт, а именно RpfE (*Resuscitation-promoting factor E*) – антиген *M. tuberculosis*, функциональная роль которого заключается в одномоментной индукции дифференцировки наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Th1 и Th17 через взаимодействие с дендритными клетками. Микобактериальный антиген RpfE стимулирует созревание последних посредством усиления экспрессии адгезивных молекул и поверхностных рецепторов, а также через стимуляцию продукции цитокинов – интерлейкинов (IL) 6, IL-1β, IL-23, IL-12 и фактора некроза опухоли (TNF) α. Подобное открытие демонстрирует, что *M. tuberculosis* имеет фактор, изучение и правильная стимуляция которого могут быть использованы для борьбы с патогеном, задействуя собственные иммунные механизмы организма, а именно реакции врожденного иммунитета, Th1- и Th17-ответа, еще раз доказывая важность указанных компонентов противотуберкулезного иммунитета [197, 198, 199]. Тем не менее, на сегодняшний день недостаточно информации о том, какова же основная роль Th17-клеток в противотуберкулезном иммунитете и как участие данных клеток отражается на характере течения туберкулезной инфекции: усугубляют ли они или, напротив, усиливают протективный иммунитет. С этих позиций нами было исследовано содержание и цитокинсекреторная активность Th17-лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ.

В ходе проведенного исследования у пациентов с ТЛ было зарегистрировано увеличение числа CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови по сравнению с группой здоровых добровольцев. Исключение составили пациенты с диссеминированным ЛУТЛ, у которых содержание данных клеток в крови, несмотря на тенденцию к увеличению, оставалось в пределах нормы (таблицы 2, 3).

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 продукции цитокинов, главным образом, IL-17 (у человека преимущественно IL-17A) и IL-22, а также IL-21, IL-26, интерферона (IFN)  $\gamma$  и хемокина CCL-20 (*C-C motif Ligand 20*) [157]. Анализ цитокинсекреторной активности моноклеарных лейкоцитов *in vitro* показал, что течение туберкулезной инфекции сопровождается увеличением базальной секреции ключевых Th17-цитокинов – IL-17A и IL-22 (таблицы 4, 5). Важно отметить, что уровень секреции IL-17A в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ оказался в 10,3 и в 7,8 раз выше, чем аналогичные показатели в группах здоровых доноров и больных с инфильтративным ЛУТЛ соответственно (таблица 5).

Увеличение численности  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ и усиление их IL-17A-, IL-22-секреторной активности, учитывая свойства данных цитокинов в целом, направлено, главным образом, на активацию и привлечение в очаг воспаления клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов и макрофагов), а также Th1-лимфоцитов – клеток адаптивного противотуберкулезного иммунитета. Действуя совместно, указанные клетки отграничивают зону повреждения в легких от ткани, не вовлеченной в патологический процесс, способствуют ослаблению, гибели и элиминации *M. tuberculosis* [26, 92, 233, 276]. Вместе с тем принимая во внимание особенности иммунологической активности IL-17A и IL-22, важно отметить индивидуальный вклад каждого из них в противотуберкулезный иммунитет.

Так, показано, что IL-17A способен усиливать воспалительную реакцию в очаге воспаления в легких посредством влияния на активность фермента циклооксигеназы (ЦОГ) 2 в моноцитах и макрофагах. Секретируемый  $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  лимфоцитами IL-17A, действуя как хемотаксический фактор, способствует привлечению моноцитов/макрофагов в легкие и активации в них ЦОГ-2, участвующей в синтезе эйкозаноидов, таких как простагландины, простаглицлины и тромбоксаны – важных компонентов

воспалительной реакции. Кроме того, простагландин E2 способствует дифференцировке макрофагов из моноцитов, что также является важным фактором в противотуберкулезном иммунитете [161, 162]. Усиление активности макрофагов под влиянием IL-17A также связано с увеличением экспрессии на их поверхности адгезивных молекул LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*). Происходящее под воздействием IL-17A увеличение экспрессии хемокина CCL2 (*C-C motif Ligand 2*) макрофагами, адгезивных молекул LFA-1 и рецептора к ним ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) активированными макрофагами, лимфоцитами и дендритными клетками способствует формированию гранулемы в инфицированном легком и облегчает взаимодействие ключевых клеток, отвечающих за борьбу с *M. tuberculosis* [97, 253].

Рядом зарубежных исследований установлено, что IL-17A активирует продукцию макрофагами провоспалительных цитокинов: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), а также стимулирует генерацию (в регионарных лимфоузлах) и активность Th1-лимфоцитов, что является важным фактором реализации специфического клеточно-опосредованного противотуберкулезного иммунитета [92, 129, 177, 276]. Также имеются сведения, что IL-17A вовлечен в формирование Th1-ответа после вакцинации против *M. tuberculosis* [57, 134].

С другой стороны, установлено, что IL-17A влияет не только на миграцию иммунокомпетентных клеток крови (ИКК), но также способствует повышению IFN- $\gamma$ -секреторной активности Т-лимфоцитов. Действуя совместно с IFN- $\gamma$ , IL-17A опосредует развитие эффективного клеточно-опосредованного иммунного ответа против *M. tuberculosis* [120]. Такой агонистичный эффект объясняется тем, что IFN- $\gamma$  стимулирует преимущественно клетки, содержащие патоген (активные фагоциты), а IL-17A регулирует воспалительную реакцию, привлекая в очаг неактивные, «покоящиеся» до получения необходимого стимулирующего сигнала ИКК [51, 151, 215]. Иначе происходит, когда концентрация одного из цитокинов значительно повышается.

В настоящем исследовании наиболее выраженные изменения продукции IL-17A в культуре *in vitro* отмечались у больных с диссеминированным ЛУТЛ (таблица 5). Согласно данным современных исследований [11, 92, 101], диссеминированный ТЛ сопровождается уменьшением числа Th1-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ . Учитывая, что IFN- $\gamma$  считается фактором, подавляющим продукцию IL-17A [108], установленное нами более высокое значение показателя секреции IL-17A у пациентов с диссеминированным ТЛ, по-видимому, обусловлено снижением секреции (по данным литературы) IFN- $\gamma$ . Следует отметить, что в последние годы стала активно развиваться новая терапевтическая стратегия, заключающаяся в создании лекарственных средств, обладающих способностью блокировать запуск программы апоптоза Т-лимфоцитов через рецептор программированной клеточной смерти PD-1 (*Programmed cell death 1*) [35] и увеличивать в крови у больных ТЛ численность гетерогенной субпопуляции IL17A<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1/Th17-клеток – полифункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти. На сегодняшний день такие пептиды, например, L91 – химерный пептид эпитопа Acr1 (*Alpha-crystallin-related protein 1*) – антигена *M. tuberculosis* и агониста TLR-2 Pam2Cys (*S*-[2,3-bis(*palmitoyloxy*)propyl] cysteine), успешно проходят испытания на мышах, значительно снижая бактериальную нагрузку у инфицированных животных. Фрагмент Pam2Cys пептида L91 стимулирует АПК через TLR-2, в то время как сигнал от микобактериального антигена Acr1 активирует формирование пулов Th1- и Th17-клеток памяти. У таких мышей отмечается значительное увеличение численности и функциональной активности Th1- и Th17-лимфоцитов, в частности секреции ими соответственно IFN- $\gamma$  и IL-17A [52]. Кроме того, известно, что для диссеминированной формы ТЛ характерно наличие периода бактериемии, когда патоген присутствует в циркулирующей крови [14, 19, 29]. Вероятно, бактериемия способствует более сильному ответу со стороны Th17-лимфоцитов, что связано с основной функцией IL17A – активацией гранулоцитопоеза и процессов дифференцировки нейтрофилов из клеток-предшественниц в костном мозге. В экспериментах на животных показано, что гиперэкспрессия IL-17A приводит к развитию



нейтрофилии в периферической крови и повышению числа клеток-предшественниц нейтрофилов в селезенке. Активация гранулоцитопоеза является важным фактором иммунной защиты против внеклеточных патогенов, включая *M. tuberculosis* в период bacterиeмии [7].

В настоящее время большое количество исследований посвящено изучению генетической природы нарушений противотуберкулезного иммунитета на основе функционального полиморфизма иммунорегуляторных генов и поиску иммуногенетических маркеров подверженности ТЛ. В частности, в работах J. Du и коллег [233] показана ассоциация генотипа *CC* полиморфизма *rs763780* гена *IL17* с повышенным риском заболеваемости ТЛ, что также обосновывает важность исследуемого цитокина в иммунопатогенезе заболевания. Данный факт подтверждают недавние исследования на животных, демонстрирующие, что индукция Th17-ответа после экспериментальной противотуберкулезной вакцинации способствовала менее тяжелому течению и благоприятному исходу инфекции, вызванной *M. bovis* [273].

При оценке базальной концентрации IL-22 в супернатантах культуральных суспензий установлено статистически значимое ее повышение у больных ТЛ независимо от клинической формы заболевания и варианта лекарственной чувствительности возбудителя (таблицы 4, 5).

Из современной научной литературы известно, что IL-22, являясь провоспалительным цитокином, участвует в развитии протективного иммунитета против *M. tuberculosis* [68, 91, 132, 166, 187]. Так, IL-22 стимулирует продукцию клетками-эффекторами IFN- $\gamma$ , что может существенно снижать ингибиторное влияние посредством гиперсекреции IL-17A. IL-22 играет важную роль в активации врожденного иммунитета путем индукции экспрессии белков острой фазы и антимикробных пептидов, таких как  $\beta$ -дефензины и семейство кальций-связывающих белков S100. Эндогенные антимикробные пептиды и белки играют важную роль в противoinфекционной защите организма, вызывая нарушения структуры или функций клеточной мембраны микроорганизмов, что, в свою очередь, ведет к их гибели. Микробицидные свойства  $\beta$ -дефензинов обусловлены

их электростатическим взаимодействием с бактериями. Пептиды ориентируются параллельно поверхности мембраны бактериальной клетки, образуя в ней сквозные поры, что приводит к лизису бактерии. В дополнение к микробицидному действию антимикробные пептиды проявляют также хемотаксическую, иммуномодулирующую и цитотоксическую активность, вносят вклад в общую защиту организма и развитие процессов воспаления [20, 102, 134, 136, 170, 220]. Кроме этого, в исследованиях на мышах показано, что  $\beta$ -дефензины через Толл-подобные рецепторы к патоген-ассоциированным паттернам (TLR) на дендритных клетках могут регулировать функции последних и стимулировать их созревание. Контактируя с антигенами бактерий,  $\beta$ -дефензины активируют дендритные клетки и запускают механизмы антиген-специфического иммунного ответа [264].

Наряду с этим, IL-22 ингибирует продукцию одного из ключевых медиаторов Th2-лимфоцитов – IL-4, способствующего поляризации иммунного ответа в направлении гуморального типа реагирования и являющегося ингибитором Th17-иммунного ответа [18].

В других исследованиях показано, что IL-22 обладает выраженным свойством усиливать фаголизосомальное слияние (т.е. формировать полноценную фаголизосому) в макрофагах, что способствует уничтожению и элиминации патогена, а также, стимулируя эпителиальные клетки и фибробласты, повышать скорость регенеративных процессов [63, 99, 134, 165, 169, 211, 220, 256].

В экспериментах на IL-22-дефицитных мышах было показано, что цитокин оказывает протективный противотуберкулезный эффект, ингибируя внутриклеточный рост *M. tuberculosis* и способствуя опосредованному CXCL13 (*C-X-C motif chemokine 13*) формированию гранулемы в легких [134, 169].

В целом, учитывая вышеизложенное, можно заключить, что установленная в настоящем исследовании гиперсекреция IL-17 и IL-22 *in vitro* у пациентов с ТЛ способствует более благоприятному течению и исходу туберкулезной инфекции.

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 туберкулезной инфекции, данная вакцина была использована для оценки резерва цитокинсекреторной функции ИКК.

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 (таблицы 4, 5), тогда как в других группах пациентов с ТЛ ответного повышения секреции указанных цитокинов на действие BCG не обнаруживалось, что свидетельствует об истощении функционального резерва (или гипо- и анергии) ИКК в условиях туберкулезной инфекции (таблицы 4, 5). Однако при этом у больных диссеминированным ТЛ и инфильтративным ЛЧТЛ BCG-индуцированная секреция IL-17A мононуклеарными лейкоцитами периферической крови оказалась выше, чем у здоровых добровольцев. 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 5).

Заслуживающим внимания результатом настоящего исследования оказался факт наиболее значимого повышения секреции IL-17A *in vitro* в группе пациентов с диссеминированным ЛУТЛ, тогда как численность Th17-лимфоцитов ( $CD4^+CD161^+IL-17A^+$  клеток) в этой группе больных оставалась в пределах нормы (таблица 3). Это позволяет предположить, что гиперсекреция анализируемого цитокина может быть связана с резким усилением цитокинсекреторной активности Th17-клеток в условиях туберкулезной инфекции и/или с усилением IL-17A-продуцирующей активности других мононуклеарных лейкоцитов крови. Вероятно, вклад в гиперсекрецию IL-17A при ТЛ вносят также  $\gamma\delta$ T-клетки [130, 140]. Показано, что содержание  $\gamma\delta$ T-клеток в некоторых случаях может достигать 90% от всех T-клеток периферической крови и держаться на таком уровне до 1 года. На сегодняшний день доказано, что течение ТЛ сопровождается увеличением содержания  $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови [29, 30, 32].

Высказывалось предположение, что эти клетки могут применяться для получения противотуберкулезной вакцины [251].

Таким образом, течение ТЛ характеризуется истощением цитокинсекреторной активности Th17-клеток в условиях BCG-индукции. В этой связи было интересным оценить уровень секреции основных цитокинов, ответственных за дифференцировку и поддержание активности зрелых Th17-лимфоцитов.

Известно, что IL-1 $\beta$  и IL-6, секретируемые мононуклеарными лейкоцитами крови, являются ключевыми факторами, ответственными за дифференцировку наивных Т-клеток по Th17-пути. Проведенный анализ секреции IL-1 $\beta$  у больных ТЛ, как в спонтанных условиях, так и в условиях BCG-индукции, не выявил значимых различий по сравнению с его уровнем в контрольной группе (таблицы 6, 7). В случае IL-6 отмечалось увеличение его базальной секреции у пациентов с инфильтративным и диссеминированным ЛЧТЛ по сравнению с нормой. BCG-стимулированная секреция IL-6 *in vitro* при инфильтративном ЛЧТЛ также оказалась выше контрольных значений. При этом значимых различий между базальной и BCG-индуцированной секрецией IL-1 $\beta$  и IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови выявлено не было (таблица 7).

При анализе содержания в супернатантах культуральных суспензий лейкоцитов другого фактора созревания Th17-лимфоцитов – TGF- $\beta$  обращало на себя внимание то, что базальная секреция цитокина значительно повышалась при диссеминированном ЛУТЛ, тогда как при инфильтративном ТЛ с устойчивостью возбудителя к средствам этиотропной терапии, напротив, снижалась (таблица 7).

Для реализации Th17-иммунного ответа важным фактором является наличие в среде IL-23, который поддерживает функциональную активность зрелых Th17-лимфоцитов. Секретируемый дендритными клетками после их взаимодействия с *M. tuberculosis* IL-23 активирует Th17-лимфоциты и продукцию ими значительных количеств IL-17А и IL-22 [69, 86, 90, 246, 252, 274]. Учитывая данное свойство IL-23, нами была проведена оценка секреции цитокина дендритными клетками *in vitro* у больных ТЛ и у здоровых добровольцев. Как

показали результаты проведенного исследования, уровень секреции IL-23 у больных ТЛ сохранялся в пределах контрольных значений (таблица 8).

Таким образом, течение ТЛ характеризуется повышением численности CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови в ассоциации с BCG-индуцированной и/или базальной гиперсекрецией *in vitro* IL-17A и IL-22 (исключение – снижение индуцированной секреции IL-22 при диссеминированном ЛЧТЛ). Указанные изменения сочетаются с гиперсекрецией *in vitro* мононуклеарными лейкоцитами крови IL-6 (за исключением больных диссеминированным ЛУТЛ) при соответствующей норме секреции других цитокинов-активаторов Th17-клеток: IL-1 $\beta$  (базальной и в случае BCG-индукции) и IL-23. Влияние IL-6 на процессы дифференцировки и активации Th17-лимфоцитов подтверждается выявленной в настоящем исследовании положительной взаимосвязью между содержанием CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-клеток в крови, концентрацией IL-17A и IL-22 *in vitro* и секрецией мононуклеарными лейкоцитами IL-6 ( $r=0,61$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,51$ ,  $p<0,05$ ;  $r=0,26$ ,  $p<0,05$  соответственно). Изменения секреции TGF- $\beta$  при ТЛ носят разнонаправленный характер: увеличение при диссеминированном ЛУТЛ и снижение при инфильтративном ЛУТЛ. В данном случае о влиянии концентрации TGF- $\beta$  в среде на созревание Th17-клеток при ТЛ (за исключением группы больных с диссеминированным ЛУТЛ) указывают обнаруженные отрицательные корреляции между количеством CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в крови, секрецией мононуклеарными лейкоцитами IL-17A и IL-22 и концентрацией *in vitro* TGF- $\beta$  ( $r=-0,55$ ,  $p<0,05$ ;  $r=-0,39$ ,  $p<0,05$ ;  $r=-0,12$ ,  $p<0,05$  соответственно).

Туберкулезная инфекция является классическим примером иммунной гиперчувствительности замедленного типа (IV типа). В связи с этим основным фактором борьбы организма человека с *M. tuberculosis* являются именно клеточные механизмы иммунной системы. В свою очередь адекватное функционирование иммунной системы невозможно без взаимной регуляции факторов врожденного и адаптивного иммунитета, в которых ключевую роль играют макрофаги/дендритные клетки и эффекторные Т-лимфоциты

соответственно. От их активности, которая связана с медиаторным влиянием цитокинов, напрямую зависит качество иммунного ответа [3, 28, 48, 79, 184, 227]. Известно, что важная роль в поддержании функциональной активности ИКК и организации и реализации противотуберкулезной резистентности отводится цитокинам – TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 [3, 22, 48, 54].

Согласно данным литературы, течение туберкулезной инфекции характеризуется снижением продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* [22]. Учитывая, что TNF- $\alpha$  индуцирует продукцию макрофагами нитроксидных радикалов и цитокинов, его дефицит негативно сказывается на формировании клеточно-опосредованного противотуберкулезного иммунитета [197].

Среди эффектов другого цитокина – TGF- $\beta$  описаны как провоспалительные (фактор хемотаксиса для гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов, стимулятор экспрессии других провоспалительных цитокинов), так и противовоспалительные (супрессия пролиферации лимфоцитов, цитотоксичности Т-лимфоцитов и антимикробных защитных функций макрофагов), что напрямую зависит от его концентрации в среде. Известно, что в высоких концентрациях TGF- $\beta$  является антагонистом TNF- $\alpha$  в отношении влияния последнего на подавление роста микобактерий. Не исключается, что дефицит продукции TGF- $\beta$  альвеолярными макрофагами (ввиду хемотаксической его функции) обеспечивает ограничение потенциально повреждающего воспалительного ответа в легочной ткани [3, 14]. С другой стороны, имеются данные, что пролиферация и дифференцировка Th17-лимфоцитов, выполняющих в организме человека защитную функцию в отношении *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- $\beta$  [29, 77, 150]. Согласно данным литературы, в низких дозах TGF- $\beta$  индуцирует дифференцировку Th17-лимфоцитов, в то время как высокие концентрации цитокина способствуют формированию Treg. Считается, что ключевым фактором, благодаря которому TGF- $\beta$  индуцирует созревание Т-клеток в Th17, является

одновременное присутствие в среде IL-6 [45]. Поясняют данный факт исследования, демонстрирующие, что для процесса дифференцировки Th17-клеток у мышей обязательным условием является наличие в среде IL-6 и TGF- $\beta$ , тогда как у человека – IL-6 и IL-1 $\beta$  без участия TGF- $\beta$  [7, 122]. E.V. Acosta-Rodrigues и соавторы (157), 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 $\beta$  достаточно для дифференцировки Th17. При добавлении антител, нейтрализующих эти цитокины, дифференцировка Th17-лимфоцитов блокировалась [157].

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

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. Имеются данные об образовании IL-6 (совместно с TNF- $\alpha$ ) клетками в составе хронической гранулемы, что является фактором формирования провоспалительного микроокружения [61, 85, 192, 201, 224]. Известно, что функционально активные Th17-лимфоциты формируются из наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на стимуляцию IL-6, который, действуя через фактор транскрипции STAT3, повышает экспрессию фактора транскрипции RORC2, в свою очередь усиливающего экспрессию основных цитокинов данного пула клеток – IL-17A и IL-22 [5].

Как упоминалось ранее, уровень секреции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови оказался повышенным в группе пациентов с инфильтративным ТЛ. Данный факт можно объяснить тем, что инфильтративная форма заболевания имеет благоприятное течение и, вероятно, механизмы иммунной защиты организма в данном случае поддерживают необходимый уровень синтеза и базальной секреции цитокина. Однако прироста секреции IL-6 после BCG-индукции мононуклеарных лейкоцитов крови не отмечалось (таблицы 6, 7). Кроме того, повышение базальной секреции IL-6 мононуклеарными лейкоцитами крови регистрировалось у пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ (таблица 7). Известно, что для диссеминированной формы туберкулезной инфекции характерным является ареактивное состояние клеточного звена иммунитета с преобладанием Th2-опосредованных реакций [14]. 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 [18, 192, 224].

IL-1 $\beta$ , секретируемый 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 воспаления, экспрессию интегринов, хемотаксис гранулоцитов, а также увеличение функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов [60, 201]. Механизм активации дифференцировки наивного CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита по пути Th17 под влиянием IL-1 $\beta$ , помимо транскрипционных факторов STAT3 и RORC2 (аналогично IL-6-зависимому пути), осуществляется посредством активации киназы PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), фактора транскрипции NF- $\kappa$ B (*Nuclear*



*factor kB*) и протеинкиназы PKC (*Protein kinase C*), а также, в комбинации с IL-6 через индукцию фактора IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*) [81, 99]. При этом следует отметить, что экспрессия рецептора для IL-1 $\beta$  (IL-1R1) на Т-лимфоците является IL-6-опосредованной [81]. Однако, как показали результаты проведенного исследования, продукция IL-1 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro* (базальная и BCG-индуцированная) у больных ТЛ независимо от клинической формы и варианта заболевания оставалась в пределах контрольных значений (таблицы 6, 7). В работе О.В. Воронковой и коллег (22) было зарегистрировано снижение базальной продукции IL-1 $\beta$  относительно контрольного уровня в период активно развивающегося патологического процесса в легких при туберкулезе. Данный факт авторы объясняли непосредственным нарушением продукции IL-1 $\beta$  в результате токсического действия *M. tuberculosis* на процессы биосинтеза ДНК и белка в клетках-продуцентах цитокина. Что касается настоящего исследования, то, вероятно, у больных ТЛ секреции IL-1 $\beta$  на уровне контрольных значений достаточно для дифференцировки Th1-лимфоцитов.

Наряду с описанными изменениями, результаты проведенного исследования продемонстрировали дефект со стороны дендритных клеток, проявляющийся в отсутствии усиления их IL-23-секреторной реакции у больных ТЛ (таблица 8).

Таким образом, на основании данных литературы и полученных собственных данных, можно заключить, что при ТЛ отмечается дефект врожденного звена иммунитета. Однако не менее важным компонентом защиты организма человека против *M. tuberculosis* является адаптивный иммунитет. Многочисленными исследованиями продемонстрировано, что течение ТЛ характеризуется угнетением Th1-звена клеточно-опосредованного иммунитета [11, 21, 29, 57, 100, 278]. Учитывая дефект индуктивной фазы иммунитета (на этапе активации дендритных клеток при связывании с *M. tuberculosis*), а также дефицит Th1-эффекторных лимфоцитов, можно заключить, что в условиях 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 фагоцитарного звена и Th1-лимфоцитов. Так, например, показано, что ТЛ характеризуется повышением трансформационной активности моноцитов в дендритные клетки *in vitro* и, следовательно, увеличением их численности в крови у больных туберкулезом [4].

Принимая во внимание вышеописанные свойства Th17-лимфоцитов, компенсация недостаточности Th1-иммунного ответа, по нашему мнению, может обеспечиваться увеличением численности и функциональной активности именно этой субпопуляции Т-клеток. Усиление функциональной активности Th17-лимфоцитов при ТЛ в данном случае подтверждается 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 ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ). Поскольку IL-17A и IL-22 обладают хемоаттрактантными и иммуномодулирующими свойствами, то они в некоторой степени могут компенсировать эти и другие функции цитокинов, секретируемых фагоцитами [119, 177]. В ряде научных работ IL-17A охарактеризован как цитокин-индуцирующий медиатор, проявляющий провоспалительные и гемопоетические функции за счет способности к стимуляции и высвобождению вторичных цитокинов и хемокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ ), демонстрируя свои физиологические эффекты на различных типах клеток [7, 108, 175, 180].

В подтверждение возможности компенсации недостаточности реакций клеточного иммунного ответа Th17-лимфоцитами и секретируемыми ими цитокинами можно привести ряд фактов. В первую очередь, Th17-клетки могут преобразовываться в Th1 или в 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, как упоминалось ранее, функциональная пластичность Th17-лимфоцитов проявляется способностью к экспрессии цитокинов других клеточных субпопуляций,

например, при их трансформации в IL-17A<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Th1/Th17-клетки. В данном случае Th17 не преобразуются в другую субпопуляцию клеток (в Th1), но становятся способными поддерживать важнейшую их функцию – секретировать IFN- $\gamma$ . Вместе с тем, несмотря на то, что Th1 могут подавлять генерацию Th17 с помощью ингибирующих сигналов от IFN- $\gamma$  [108], IL-17A, в свою очередь, может выступать в качестве позитивного регулятора дифференцировки Th1 при ряде внутриклеточных инфекций, таких как хламидийная, туберкулезная и др. [125, 127, 140]. Показано, что IL-17A индуцирует продукцию IL-12 дендритными клетками, а также продукцию IL-12 и IFN- $\gamma$  макрофагами, опосредуя тем самым формирование IL-12-зависимого Th1-ответа, а также стимуляцию врожденного иммунитета [125]. Кроме того, имеются данные, что IL-17A оказывает содействие хемоаттрактантам в стимуляции и адгезии лейкоцитов (моноцитов, эозинофилов, Т-клеток) путем влияния на продукцию CCL5 (*C-C motif ligand 5*) [156].

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что установленное в настоящем исследовании увеличение численности CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ, а также их IL-17A и IL-22-секреторной активности, вероятно, может рассматриваться как иммунная реакция, направленная на компенсацию функциональной недостаточности, в первую очередь, Th1-лимфоцитарного звена иммунитета (рисунок 8). Вместе с тем в условиях отсутствия выраженной активации секреции IL-1 $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови у больных ТЛ и сходства его биологической активности с Th17-цитокинами (в частности, хемотаксис гранулоцитов и фагоцитов, усиление продукции факторов воспаления, усиление 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

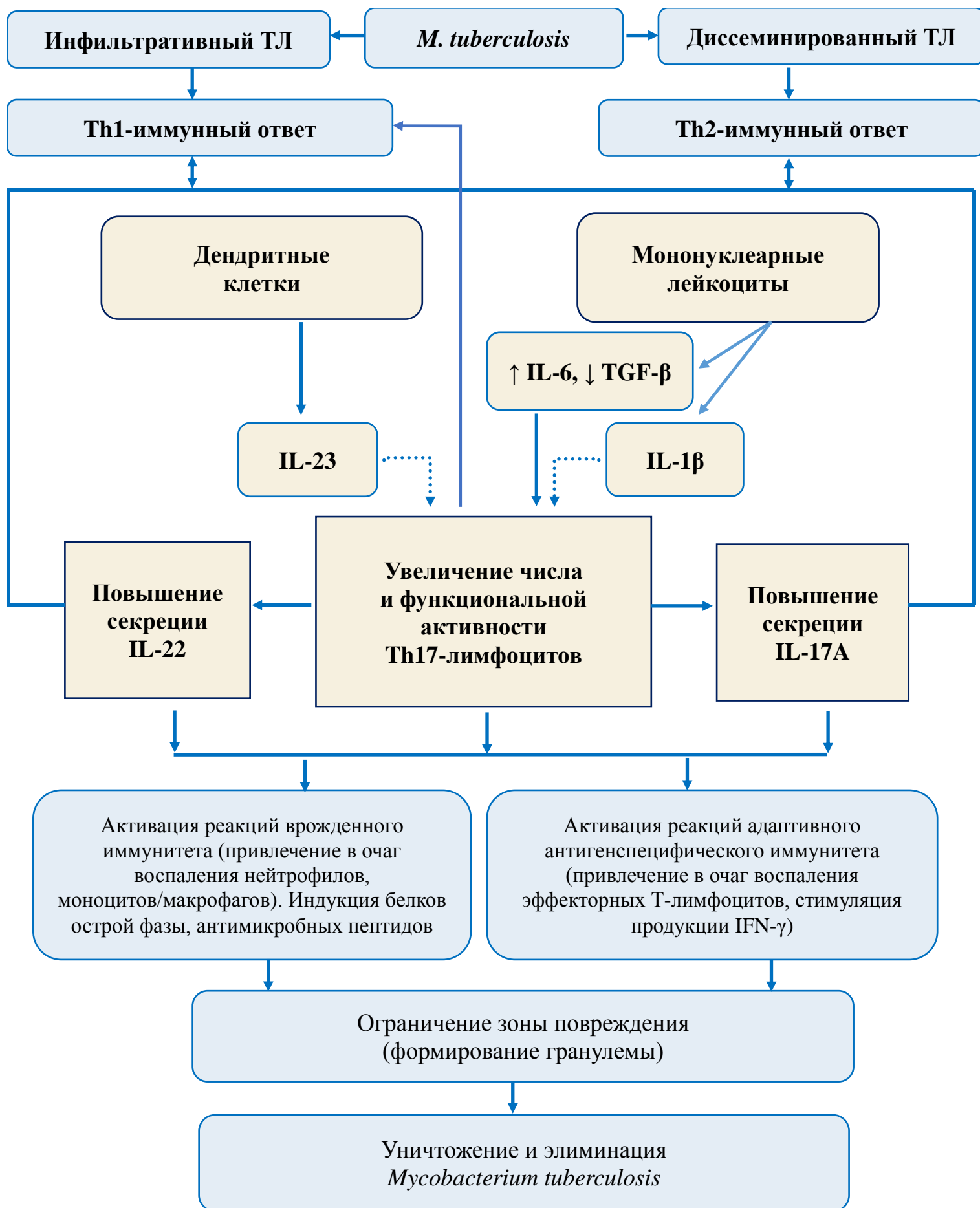


Рисунок 8 – Схема активации Th17-лимфоцитов при туберкулезе легких по данным литературы (выделено голубым цветом) и результатам собственных исследований (выделено желтым цветом); прерывистая стрелка – эффект цитокина отсутствует.

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  $0,123 \times 10^9/\text{л}$ ).
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- $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*.
5. При гиперсекреции TGF- $\beta$  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. Секреция *in vitro* IL-1 $\beta$  (базальная и BCG-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения / Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, А.А. Буркова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 1, № 3. – С. 56–62.
2. Бронштейн, И.Н. Справочник по математике для инженеров и учащихся вузов : учебное пособие / И.Н. Бронштейн, К.А. Семендяев. – СПб. : Лань, 2009. – 608 с.
3. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких. Иммунодиагностика и иммунотерапия / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. – Томск : Печатная мануфактура, 2013. – 84 с.
4. Дитто, З.К. Факторы дисфункции дендритных клеток при туберкулезе легких : автореф. дис. ... канд. мед. наук / З.К. Дитто. – Томск, 2013. – 21 с.
5. Дьяченко, П.А. Роль Th17 – клеток в патогенезе аутоиммунных заболеваний / П.А. Дьяченко, А.Г. Дьяченко // Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина. – 2010. – № 2. – С. 14–22.
6. Железникова, Г.Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию / Г.Ф. Железникова // Журнал инфектологии. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 6–13.
7. Значение Th17-пути дифференцировки лимфоцитов в патогенезе ювенильного идиопатического артрита / И.З. Турцевич, Г.А. Новик, Н.М. Калинина и др. // Лечащий врач. – 2014. – № 9. – С. 52–58.
8. Зурочка, А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7–16.
9. Иванов, В.В. Исследование концентрации цитокинов, вырабатываемых Th2-лимфоцитами, у больных парагриппом / В.В. Иванов, М.В. Шипилов // Медицина: вызовы сегодняшнего дня : материалы международной научной конференции. – Челябинск, 2012. – С. 39–41.

10. Ивашкин, В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – №4. – С. 4–13.
11. Игнатова, М.С. Нарушения сигнального JAK-STAT-пути активации Т-лимфоцитов при туберкулезе легких : автореф. дис. ... канд. мед. наук / М.С. Игнатова. – Томск, 2014. – 21 с.
12. Иммуногенетический профиль больных туберкулезом легких и возможности совершенствования терапии / Л.И. Арчакова, Б.Е. Кноринг, М.В. Павлова, М.Н. Смирнов // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2009. – № 2. – С. 61–66.
13. Иммунопатология туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. – Томск : Изд-во Томского университета, 2007. – 194 с.
14. Иммуносупрессорные эффекты регуляторных Т-лимфоцитов крови при диссеминированном туберкулезе легких с множественной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Т.Е. Кононова // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 143 – 146.
15. Иммуносупрессорные эффекты Т-регуляторных клеток при инфильтративном туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 4. – С. 26–29.
16. Исследование уровня циркулирующих цитокинов у больных атопическим дерматитом / Е.Н. Волкова, С.Г. Морозов, М.В. Тарасова, А.А. Григорьева и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 2. – С. 26–30.
17. Кетлинский, С.А. Th17 – новая линия дифференцировки Т-хелперов: обзор данных / С.А. Кетлинский // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 2. – С. 3–15.
18. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 549 с.



19. Лядова, И.В. Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования / И.В. Лядова, В.Я. Гергерт // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 9–18.
20. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа / И.В. Кологривова, Е.Н. Кологривова, Т.Е. Суслова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 93–99.
21. Молекулярные факторы нарушений цитокинзависимой активации Т-лимфоцитов при туберкулезе легких / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, М.С. Игнатова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 390–392.
22. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остропрогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 3. – С. 42–50.
23. Особенности формирования гуморального иммунного ответа у больных туберкулезом / И.М. Хаертынова, Р.Ш. Валиев, А.П. Цибулькин, Ф.К. Сиразиева и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – Т. 84, № 8. – С. 47–50.
24. Опосредованная Т-лимфоцитами-хелперами типа 17 регуляция антибактериального (противотуберкулезного) иммунитета / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 883–890.
25. Особенности Т-клеточной иммунорегуляции при невынашивании беременности: эволюция парадигмы / А.И. Макаров, С.Н. Буянова, О.Г. Иванова, А.П. Линник // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – № 5. – С. 10–16.
26. Перельман, М. И. Фтизиатрия / М.И. Перельман, В.А. Корякин, И.В. Богадельникова. – М. : ГЭОТАР-МЕДИА, 2007. – 512 с.

27. Писаренко, М.С. Особенности секреции интерферона-гамма при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / М.С. Писаренко // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9, ч. 3. – С. 444–447.
28. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–87.
29. Регуляторные Т-клетки и противотуберкулезный иммунитет / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2014. – 156 с.
30. Роль  $\gamma\delta$ Т- и NK-клеток в иммунном ответе / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 138–142.
31. Смирнова, О.В. Роль клеток системы иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы / О.В. Смирнова, Л.Р. Выхристенко // Медицинские новости. – 2011. – № 5. – С. 18–19.
32. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 183–186.
33. Топтыгина, А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи / А.П. Топтыгина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 7–17.
34. Туберкулез. Особенности течения, возможности фармакотерапии : учебное пособие для врачей / под ред. А.К. Иванова. – СПб. : Тактик-Студио, 2009. – 108 с.
35. PD-1/B7-H1-опосредованная про-апоптогенная активность дендритных клеток как возможный механизм нарушения антиген-специфического ответа у больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова,

- Т.В. Тыринова и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 8, № 1-2. – С. 59–66.
36. Tfh – новая линия дифференцировки Т-хелперов: происхождение, фенотип, эффекторные функции, роль в развитии аутоиммунной патологии / А.М. Камышный, И.В. Гриневич, А.С. Деген и др. // Патология. – 2011. – Т. 8, № 3. – С. 4–1.
  37. Th17-клетки и их роль в развитии аутоиммунных заболеваний / А.М. Камышный, И.В. Гриневич, А.С. Деген и др. // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т. 13, № 6. – С. 81–87.
  38. Уровень цитокинов в плазме крови у больных активным инфильтративным туберкулезом легких / А.В. Шкарин, С.С. Белоусов, О.А. Аникина // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 8. – С. 34–38.
  39. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 103–111.
  40. Флейс, Дж. Статистические методы для изучения долей и пропорций / Дж. Флейс ; пер. с англ. И.Л. Легостаевой, А.М. Никифорова ; под ред. Ю.Н. Благовещенского. – М. : Финансы и статистика, 1989. – 317 с.
  41. Хаитов, Р.М. Иммунология : учебник для студентов / Р.М. Хаитов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 528 с.
  42. Чернушенко, Е.Ф. Противотуберкулезный иммунитет (Часть I) / Е.Ф. Чернушенко, Р.Г. Процюк // Украинский пульмонологический журнал. – 2010. – № 10. – С. 53–58.
  43. Шепелькова, Г.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулеза на экспериментальных моделях / Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, А.С. Апт // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 7. – С. 3–11.
  44. Шипилов, М.В. Th17-ответ организма при острых респираторных вирусных инфекциях различного генеза / М.В. Шипилов, В.В. Иванов // Цитокины и воспаление. – 2012. – № 1. – С. 109–113.

45. Экспрессия мРНК транскрипционных факторов RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах у больных туберкулезом легких / Т.Е. Кононова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина и др. // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 1. – С. 56–61.
46. Эозинофил в норме и при патологии / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Томск : Печатная мануфактура, 2014. – 124 с.
47. Ярилин, А.А. Иммунология : учебник / А.А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
48. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis / C. Sutton, C. Brereton, B. Keogh et al. // J. Exp. Med. – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1685–1691.
49. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17 / H. Park, Z. Li, X.O. Yang et al. // Nat. Immunol. – 2005. – Vol. 6, N 11. – P. 1133–1141.
50. A monovalent anti-human CD28 domain antibody antagonist: preclinical efficacy and safety / S.J. Suchard, P.M. Davis, S. Kansal et al. // J. Immunol. – 2013. – Vol. 191, N 9. – P. 4599–4610.
51. A new recombinant BCG vaccine induces specific Th17 and Th1 effector cells with higher protective efficacy against tuberculosis / A.C. da Costa, O. Costa-Júnior Ade, F.M. de Oliveira et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 11. – P. e112848.
52. A novel therapeutic strategy of lipidated promiscuous peptide against *Mycobacterium tuberculosis* by eliciting Th1 and Th17 immunity of host / P.K. Rai, S.B. Chodisetti, S. Nadeem et al. // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 1–11.
53. A rho GDP dissociation inhibitor produced by apoptotic T-cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* / S. Venkatasubramanian, R. Dhiman, P. Paidipally et al. // PLOS Pathog. – 2015. – Vol. 11, N 2. – P. e1004617.
54. A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection / M.L. Manni, K.M. Robinson, J.F. Alcorn // Expert Rev. Respir. Med. – 2014. – Vol. 8, N 1. – P. 25–42.

55. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells / J.-M. Ramirez, N.C. Brembilla, O. Sorg et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40, N 9. – P. 2450–2459.
56. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo* / C. Lienhardt, A. Azzurri, A. Amedei et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32, N 6. – P. 1605–1613.
57. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit *Mycobacterium tuberculosis* vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation / K. Werninghaus, A. Babiak, O. Gross et al. // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206, N 1. – P. 89–97.
58. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [Electronic resource] / S. Ahmad // *Clin. Dev. Immunol.* – 2011. – Vol. 2011. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2011/814943/>.
59. Allele-specific induction of IL-1 $\beta$  expression by C/EBP $\beta$  and PU.1 contributes to increased tuberculosis susceptibility / G. Zhang, B. Zhou, S. Li et al. // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10, N 10. – P. e1004426.
60. Analysis of plasma cytokine and chemokine profiles in patients with and without tuberculosis by liquid array-based multiplexed immunoassays / W. Xiong, H. Dong, J. Wang et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, N 2. – P. e0148885.
61. Analysis of Toll-like receptors, iNOS and cytokine profiles in patients with pulmonary tuberculosis during anti-tuberculosis treatment / L.R. de Oliveira, E. Peresi, M. de A. Golim et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. e88572.
62. Annunziato, F. Do studies in humans better depict Th17 cells? / F. Annunziato, S. Romagnani // *Blood.* – 2009. – Vol. 114, N 11. – P. 2213–2219.
63. Biology of interleukin-22 / K. Wolk, E. Witte, K. Witte et al. // *Semin. Immunopathol.* – 2010. – Vol. 32, N 1. – P. 17–31.
64. Blockade of IL-10 signaling during BCG vaccination enhances and sustains Th1, Th17, and innate lymphoid IFN- $\gamma$  and IL-17 responses and increases protection to

- Mycobacterium tuberculosis* infection / J.M. Pitt, E. Stavropoulos, P.S. Redford et al. // J. Immunol. – 2012. – Vol. 189, N 8. – P. 4079–4087.
65. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22 / G.F. Sonnenberg, L.A. Fouser, D. Artis // Nat. Immunol. – 2011. – Vol. 12, N 5. – P. 383–390.
  66. CCR6/CCL20 chemokine expression profile in distinct colorectal malignancies / V.O. Frick, C. Rubie, K. Kölsch et al. // Scand. J. Immunol. – 2013. – Vol. 78, N 3. – P. 298–305.
  67. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC / L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone et al. // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol. 40, N 8. – P. 2174–2181.
  68. CD4+ T cells are required to contain early extrathoracic TB dissemination and sustain multi-effector functions of CD8+ T and CD3– lymphocytes / S. Yao, D. Huang, C.Y. Chen et al. // J. Immunol. – 2014. – Vol. 192, N 5. – P. 2120–2132.
  69. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis [Electronic resource] / J. Zuñiga, D. Torres-Garcia, T. Santos-Mendoza et al. // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – Vol. 2012. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/193923/>.
  70. Chang, S.H. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses / S.H. Chang, C. Dong // Cell Res. – 2007. – Vol. 17, N 5. – P. 435–440.
  71. Chang, S.H. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation / S.H. Chang, C. Dong // Cell Signal. – 2011. – Vol. 23, N 7. – P. 1069–1075.
  72. Characterization of dendritic cell and regulatory T cell functions against *Mycobacterium tuberculosis* infection [Electronic resource] / D. Morris, B. Gonzalez, M. Khurasany et al. // BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676983/>.

73. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis / Q. Tan, W.P. Xie, R. Min et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 31, N 6. – P. 1233–1242.
74. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa / I. Monteleone, M. Sarra, G. Del Vecchio Blanco et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, N 4. – P. 2211–2218.
75. Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma [Electronic resource] / P. Middel, S. Brauneck, W. Meyer et al. // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol. 10, N 578. – URL: <http://resolver.sub.uni-goettingen.de/purl?gs-1/5656>.
76. Chen, X. Th17 cells and Tregs: unlikely allies / X. Chen, J.J. Oppenheim // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – Vol. 95, N 5. – P. 723–731.
77. Chen, Z. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells / Z. Chen, J.J. O'Shea // *Immunol. Res.* – 2008. – Vol. 41, N 2. – P. 87–102.
78. Cocco, C. Anti-leukemic properties of IL-12, IL-23 and IL-27: Differences and similarities in the control of pediatric B acute lymphoblastic leukemia / C. Cocco, V. Pistoia, I. Airolidi // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2012. – Vol. 83, N 3. – P. 310–318.
79. Control of regulatory T cell and Th17 cell differentiation by inhibitory helix-loop-helix protein Id3 / T. Maruyama, J. Li, J.P. Vaque et al. // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol. 12, N 1. – P. 86–95.
80. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling / Y. Chung, S.H. Chang, G.J. Martinez et al. // *Immunity.* – 2009. – Vol. 30, N 4. – P. 576–587.
81. Crystal structure of interleukin 17 receptor B SEFIR domain / B. Zhang, C. Liu, W. Qian et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190, N 5. – P. 2320–2326.
82. Cutting edge: the pathogenicity of IFN- $\gamma$ -producing Th17 cells is independent of T-bet / R. Duhon, S. Glatigny, C.A. Arbelaes et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190, N 9. – P. 4478–4482.

83. Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines / K.O. Busman-Sahay, T. Walrath, S. Huber, W. J. O'Connor // J. Leukoc. Biol. – 2015. – Vol. 97, N 3. – P. 499–510.
84. Dendritic cells in chronic mycobacterial granulomas restrict local anti-bacterial T cell response in a murine model / H.A. Schreiber, P.D. Hulseberg, J. Lee et al. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 7. – P. e11453.
85. Desvignes, L. IFN $\gamma$ -responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* / L. Desvignes, J.D. Ernst // Immunity. – 2009. – Vol. 31, N 6. – P. 974–985.
86. Development and function of TH17 cells in health and disease / J. Louten, K. Boniface, de Waal R. Malefyt // J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 123, N 5. – P. 1004–1011.
87. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells / N.J. Wilson, K. Boniface, J.R. Chan et al. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 9. – P. 950–957.
88. Differentiation and recruitment of Th9 cells stimulated by pleural mesothelial cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection / Z-J. Ye, M-L. Yuan, Q. Zhou et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 2. – P. 1–12.
89. Diverting T helper cell trafficking through increased plasticity attenuates autoimmune encephalomyelitis / D. Califano, K.J. Sweeney, H. Le et al. // J. Clin. Invest. – 2014. – Vol. 124, N 1. – P. 174–187.
90. Distinct chemokine and cytokine gene expression pattern of murine dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection / S. Jang, A. Uzelac, P. Salgame // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol. 84, N 5. – P. 1264–1270.
91. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response / T. Scriba, B. Kalsdorf, D. Abrahams et al. // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, N 3. – P. 1962–1970.



92. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus / K. Shah, W.W. Lee, S.H. Lee et al. // *Arthritis Res. Ther.* – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. R53.
93. Early dynamics of T helper cell cytokines and T regulatory cells in response to treatment of active *Mycobacterium tuberculosis* infection / S.L. Feruglio, K. Tonby, D. Kvale, A.M. Dyrhol-Riise // *Clin. Exp. Immunol.* – 2015. – Vol. 179, N 3. – P. 454–465.
94. Early pulmonary cytokine and chemokine responses in mice immunized with three different vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* determined by PCR array / J. Lim, S.C. Derrick, K. Kolibab et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 122–126.
95. Enhanced T cell responsiveness to *Mycobacterium bovis* BCG r32-kDa Ag correlates with successful anti-tuberculosis treatment in humans / V.H. Sai Priya, G.S. Latha, S.E. Hasnain et al. // *Cytokine.* – 2010. – Vol. 52, N 3. – P. 190–193.
96. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells / R. Nurieva, X.O. Yang, G. Martinez et al. // *Nature.* – 2007. – Vol. 448, N 7152. – P. 480–483.
97. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung / Y. Okamoto Yoshida, M. Umemura, A. Yahagi et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, N 8. – P. 4414–4422.
98. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- $\beta$ -induced Foxp3 expression / S. Ikeda, S. Saijo, M.A. Murayama et al. // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192, N 4. – P. 1449–1458.
99. Expansion of pathogen-specific T-Helper 1 and T-Helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus / N.P. Kumar, R. Sridhar, V.V. Banurekha et al. // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 208, N 5. – P. 739–748.
100. Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis / J.S. Lee, J.Y. Lee, J.W. Son et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 67, N 1. – P. 77–85.

101. Expression pattern of transcription factors and intracellular cytokines reveals that clinically cured tuberculosis is accompanied by an increase in mycobacterium-specific Th1, Th2, and Th17 cells [Electronic resource] / M.V. da Silva, V.J. Massaro Junior, J.R. Machado et al. // *BioMed Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/591237>.
102. Eyerich, K. Th22 cells in allergic disease / K. Eyerich, S. Eyerich // *Allergo J. Int.* – 2015. – Vol. 24, N 1. – P. 1–7.
103. Forkhead box protein 3 (FOXP3) mutations lead to increased TH17 cell numbers and regulatory T-cell instability / L. Passerini, S. Olek, S. Di Nunzio et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – Vol. 128, N 6. – P. 1376–1379.
104. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis / P.K. Sharma, P.K. Saha, A. Singh et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 179, N 11. – P. 1061–1070.
105. Functional specialization of interleukin-17 family members / Y. Iwakura, H. Ishigame, S. Saijo, S. Nakae // *Immunity.* – 2011. – Vol. 34, N 2. – P. 149–162.
106. Gaffen, S.L. An overview of IL-17 function and signaling / S.L. Gaffen // *Cytokine.* – 2008. – Vol. 43, N 3. – P. 402–407.
107. Gaffen, S.L. Recent advances in the IL-17 cytokine family / S.L. Gaffen // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – Vol. 23, N 5. – P. 613–619.
108. Guo, H. Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection / H. Guo, D.J. Topham // *J. Virol.* – 2010. – Vol. 84, N 15. – P. 7750–7759.
109. Hale, J.S. Memory T Follicular Helper CD4 T Cells / J.S. Hale, R. Ahmed // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6, N 16. – P. 1–9.
110. Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit mono- and multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in a process dependent on IL-10 / P.J. George, R. Anuradha, N.P. Kumar et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 10, N 9. – P. 1004375.

111. Helper T cell epitope-mapping reveals MHC-peptide binding affinities that correlate with T helper cell responses to pneumococcal surface protein A / P.K. Sharma, R. Singh, S. Singh et al. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 2. – P. 9432.
112. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor / Z. Yao, W.C. Fanslow, M.F. Seldin et al. // Immunity. – 1995. – Vol. 3, N 6. – P. 811–821.
113. Ho, A.W. IL-17RC: A partner in IL-17 signaling and beyond / A.W. Ho, S.L. Gaffen // Semin. Immunopathol. – 2010. – Vol. 32, N 1. – P. 33–42.
114. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells / Z. Yao, S.L. Painter, W.C. Fanslow et al. // J. Immunol. – 1995. – Vol. 155, N 12. – P. 5483–5486.
115. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens / K. Geddes, S.J. Rubino, J.G. Magalhaes et al. // Nat. Med. – 2011. – Vol. 17, N 7. – P. 837–844.
116. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4<sup>+</sup> T cells / J.F. Wright, Y. Guo, A. Quazi et al. // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, N 18. – P. 13447–13455.
117. Identification of IL-17-producing FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans / K.S. Voo, Y.-H. Wang, F.R. Santori et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2009. – Vol. 106, N 12. – P. 4793–4798.
118. Identification of *Mycobacterium tuberculosis*-specific Th1, Th17 and Th22 cells using the expression of CD40L in tuberculous pleurisy / L. Li, D. Qiao, X. Fu et al. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 5. – P. e20165.
119. IL-17 and IFN- $\gamma$  expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease / J.O. Jurado, V. Pasquinelli, I.B. Alvarez et al. // J. Leukoc. Biol. – 2012. – Vol. 91, N 6. – P. 991–1002.
120. IL-17 and IFN- $\gamma$  production in peripheral blood following BCG vaccination and *Mycobacterium tuberculosis* infection in human / Q. Li, J. Li, J. Tian et al. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2012. – Vol. 16, N 14. – P. 2029–2036.

121. IL-17 and Th17 Cells / T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 485–517.
122. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling / C. Gu, L. Wu, X. Li // *Cytokine.* – 2013. – Vol. 64, N 2. – P. 477–485.
123. IL-17 family member cytokines: regulation, and function in innate immunity / J.M. Reynolds, P. Angkasekwinai, C. Dong // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – Vol. 21, N 6. – P. 413–423.
124. IL-17 is required for Th1 immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis* / Y. Lin, S. Ritchea, A. Logar et al. // *Immunity.* – 2009. – Vol. 31, N 5. – P. 799–810.
125. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury / L. Li, L. Huang, A.L. Vergis et al. // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120, N 1. – P. 331–342.
126. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function / H. Bai, J. Cheng, X. Gao et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 9. – P. 5886–5895.
127. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  / M. Iyoda, T. Shibata, M. Kawaguchi et al. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, N 3. – P. F779–F787.
128. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection [Electronic resource] / H.-C. Tsai, S. Velichko, L.-Y. Hung, R. Wu // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/267971>.
129. IL-17A is produced by Th17,  $\gamma\delta$  T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica serovar Enteritidis* and has a mild effect in bacterial clearance / S.M. Schulz, G. Kohler, C. Holscher et al. // *International Immunology.* – 2008. – Vol. 9, N 9. – P. 1129–1138.

130. IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells are regulated by estrogen during development of experimental arthritis / A. Andersson, L. Grahnemo, C. Engdahl et al. // Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 161, N 2. – P. 324–332.
131. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Th-lymphocytes / K. Ley, E. Smith, M. Stark // Immunol. Res. – 2006. – Vol. 34, N 3. – P. 229–242.
132. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin Infection / M. Umemura, A. Yahagi, S. Hamada // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178, N 6. – P. 3786–3796.
133. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells / T. Korn, E. Bettelli, W. Gao et al. // Nature. – 2007. – Vol. 448, N 7152. – P. 484–487.
134. IL-22 is mainly produced by IFN $\gamma$ -secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection / J. Behrends, J.C. Renauld, S. Ehlers, C. Hölscher // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 2. – P. e57379.
135. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a Stat3-dependent manner / L. Wei, A. Laurence, K. Elias, J. O'Shea // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, N 48. – P. 34605–34610.
136. IL-22, cell regeneration and autoimmunity [Electronic resource] / E. Nikoopour, S.M. Bellemore, B. Singh // Cytokine. – 2014. – URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.007>.
137. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion / R. Dhiman, M. Indramohan, P.F. Barnes et al. // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, N 10. – P. 6639–6645.
138. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling / Y. Ji, X. Yang, J. Li et al. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2014. – Vol. 7, N 7. – P. 3694–3703.
139. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4(+) T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge /

- S.A. Khader, G.K. Bell, J.E. Pearl et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 4. – P. 369–377.
140. IL-23-dependent  $\gamma\delta$  T cells produce IL-17 and accumulate in enthesitis, aortic valve, and ciliary body [Electronic resource] / A. Reinhardt, T. Yevsa, T. Worbs et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27111864#>.
  141. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung / S.A. Khader, L. Guglani, J. Rangel-Moreno et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, N 10. – P. 5402–5407.
  142. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation / M.A. Kleinschek, A.M. Owyang, B. Joyce-Shaikh et al. // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204, N 1. – P. 161–170.
  143. IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation / M. Corvaisier, Y. Delneste, H. Jeanvoine et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 10, N 9. – P. 1001395.
  144. IL-26 promotes the proliferation and survival of human gastric cancer cells by regulating the balance of STAT1 and STAT3 activation / W. You, Q. Tang, C. Zhang et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 5. – P. 63588.
  145. IL-4-, TGF- $\beta$ - and IL-1-dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis / R. Anuradha, P.J. George, L.E. Hanna et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 191, N 5. – P. 2466–2473.
  146. IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR $\gamma$ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis / T. Yamashita, T. Iwakura, K. Matsui et al. // *Cardiovascular Research.* – 2011. – Vol. 91. – P. 640–648.
  147. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways / L. Zhou, I.I. Ivanov, R. Spolski et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8, N 9. – P. 967–974.

148. Imbalance of Th17 cells and regulatory T cells in tuberculous pleural effusion / Z.J. Ye, Q. Zhou, R.H. Du et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2011. – Vol. 18, N 10. – P. 1608–1615.
149. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy / G. Caramori, L. Lasagna, A.G. Casalini et al. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 7. – P. e22637.
150. Immunotherapy with Leukocyte Immunomodulator Dialysate in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis / S.O. Cherenko, O.A. Reva, O.M. Rekalova et al. // Asthma and allergy. – 2013. – Vol. 3. – P. 13–20.
151. Impaired M. tuberculosis antigen-specific IFN- $\gamma$  response without IL-17 enhancement in patients with severe cavitary pulmonary tuberculosis / L. Fan, H. Xiao, G. Mai et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 5. – P. e0127087.
152. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome / J.D. Milner, J.M. Brechley, A. Laurence et al. // Nature. – 2008. – Vol. 452, N 7188. – P. 773–776.
153. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis / B. Ten Berge, M.S. Paats, I.M. Bergen et al. // Rheumatology. – 2012. – Vol. 51, N 1. – P. 37–46.
154. Increased pulmonary tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 (IL-6), and IL-17A responses compensate for decreased gamma interferon production in anti-IL-12 autovaccine-treated, *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated mice / D. Freches, M. Romano, H. Korf et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2011. – Vol. 18, N 1. – P. 95–104.
155. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice / C. Erbel, L. Chen, F. Bea et al. // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, N 12. – P. 8167–875.
156. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor –  $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17 – producing human T helper cells / E.V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia et al. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 9. – P. 942–949.

157. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity / C.E. Sutton, S.J. Lalor, C.M. Sweeney et al. // *Immunity*. – 2009. – Vol. 31, N 2. – P. 331–341.
158. Interleukin-12 to interleukin «infinity»: the rationale for future therapeutic cytokine targeting / E.J.R. Anderson, M.A. McGrath, T. Thalhamer, I.B. McInnes // *Springer Semin. Immunopathol.* – 2006. – Vol. 27, N 4. – P. 425–442.
159. Interleukin-17 and type 17 helper T cells / P. Miossec, T. Korn, V.K. Kuchroo // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 361, N 9. – P. 888–898.
160. Interleukin-17-dependent CXCL-13 mediates mucosal vaccine-induced immunity against tuberculosis / R. Gopal, J. Rangel-Moreno, S. Slight et al. // *Mucosal Immunol.* – 2013. – Vol. 6, N 5. – P. 975–984.
161. Interleukin-17 indirectly promotes M2 macrophage differentiation through stimulation of COX-2/PGE2 pathway in the cancer cells / Q. Li, L. Liu, Q. Zhang et al. // *Cancer Res. Treat.* – 2014. – Vol. 46, N 3. – P. 296–307.
162. Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell-proliferation of endometriotic stromal cells / T. Hirata, Y. Osuga, K. Hamasaki et al. // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149, N 3. – P. 1260–1267.
163. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides / S.C. Liang, X.-Y. Tan, D.P. Luxenberg et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, N 10. – P. 2271–2279.
164. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 11. – P. 1123–1132.
165. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection / E. Witte, K. Witte, K. Warszawska et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – Vol. 21, N 5. – P. 365–379.
166. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation / L.A. Zenewicz, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela et al. // *Immunity*. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 647–659.



167. Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains / M.O. Neto, J.R. Ferreira, D. Colau et al. // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94, N 5. – P. 1754–1765.
168. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10 / D. Lejeune, L. Dumoutier, S. Constantinescu et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 37. – P. 33676–33682.
169. Interleukin 22 inhibits intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing calgranulin A expression / R. Dhiman, S. Venkatasubramanian, P. Paidipally et al. // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209, N 4. – P. 578–587.
170. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens / Y. Zheng, P.A. Valdez, D.M. Danilenko et al. // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14, N 3. – P. 282–289.
171. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 / S. Aggarwal, N. Ghilardi, M.H. Xie et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, N 3. – P. 1910–1914.
172. Interleukin-26 in antibacterial host defense of human lungs. Effects on neutrophil mobilization / K.F. Che, S. Tengvall, B. Levänen // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2014. – Vol. 190, N 9. – P. 1022–1031.
173. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells / E.V. Acosta-Rodrigues, G. Napolitani, A. Lanzayecchia et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 942–949.
174. Jiang, S. TH17 in health and disease. Springer-Verlag New York Inc., 2011. – 552 p.
175. Jin, W. IL-17 cytokines in immunity and inflammation / W. Jin, C. Dong // *Emerg. Microbes Infect.* – 2013. – Vol. 2, N 9. – P. 1–5.
176. Khader, S.A. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens / S.A. Khader, R. Gopal // *Virulence.* – 2010. – Vol. 1, N 5. – P. 423–427.

177. Khader, S.A. IL-23 and IL-17 in tuberculosis / S.A. Khader, A.M. Cooper // Cytokine. – 2008. – Vol. 41, N 2. – P. 79–83.
178. Lack of Mycobacterium tuberculosis-specific interleukin-17A-producing CD4<sup>+</sup> T cells in active disease / M. Perreau, V. Rozot, H.C. Welles et al. // Eur. J. Immunol. – 2013. – Vol. 43, N 4. – P. 939–948.
179. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage / Y.K. Lee, H. Turner, C.L. Maynard et al. // Immunity. – 2009. – Vol. 30, N 1. – P. 92–107.
180. Laurence, A. Th17 differentiation: of mice and men / A. Laurence, J. O'Shea // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 9. – P. 903–905.
181. Lim, C. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer / C. Lim, R. Savan // Cytokine Growth Factor Rev. – 2014. – Vol. 25, N 3. – P. 257–271.
182. Lippitz, B.E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review / B.E. Lippitz // Lancet Oncol. – 2013. – Vol. 14, N 6. – P. 218–228.
183. Lyadova, I. Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression / I. Lyadova // Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity. – 2012. – 43 p.
184. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells / N. Fazilleau, M.D. Eisenbraun, L. Malherbe et al. // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 7. – P. 753–761.
185. Maturation inside and outside bone marrow dendritic cells modulated by interferon- $\alpha$  / Q. Song, Y. Meng, Y. Wang et al. // Int. Immunopharmacol. – 2013. – Vol. 17, N 3. – P. 843–849.
186. McGeachy, M.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road / M.J. McGeachy, D.J. Cua // Immunity. – 2008. – Vol. 28, N 4. – P. 445–453.
187. Membrane-bound IL-22 after de novo production in tuberculosis and anti-Mycobacterium tuberculosis effector function of IL-22<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells / G. Zeng, C.Y. Chen, D. Huang et al. // J. Immunol. – 2011. – Vol. 187, N 1. – P. 190–199.
188. Memory-like antigen-specific human NK cells from TB pleural fluids produced IL-22 in response to IL-15 or *Mycobacterium tuberculosis* antigens / X. Fu, S. Yu, B. Yang et al. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0151721.

189. Méndez-Samperio, P. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease / P. Méndez-Samperio // Int. J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 14, N 5. – P. 366–371.
190. Microarray analysis of *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes reveals *IL26* as a new candidate gene for tuberculosis susceptibility / J.M. Guerra-Laso, S. Raposo-Garcia, S. Garcia-Garcia et al. // Immunol. – 2015. – Vol. 144, N 2. – P. 291–301.
191. MicroRNA-365 in macrophages regulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced active pulmonary tuberculosis via interleukin-6 / Q. Song, H. Li, H. Shao // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol. 8, N 9. – P. 15458–15465.
192. Miller, S.A. Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment / S.A. Miller, A.S. Weinmann // Immunol. Rev. – 2010. – Vol. 238, N 1. – P. 233–246.
193. Miossec, P. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation / P. Miossec, J.K. Kolls // Nature Reviews. – 2012. – Vol. 11, N 5. – P. 763–776.
194. Miyara, M. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns / M. Miyara, S. Sakaguchi // Immunol. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 89, N 3. – P. 346–351.
195. *Mycobacterium bovis* BCG infection severely delays *Trichuris muris* expulsion and co-infection suppresses immune responsiveness to both pathogens / H.J. Nel, N. Plessis, L. Kleynhans et al. // BMC Microbiology. – 2014. – Vol. 14, N 9. – P. 1–13.
196. *Mycobacterium tuberculosis Beijing* genotype induces differential cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of healthy BCG vaccinated individuals / A. Rivera-Ordaz, J. Gonzaga-Bernachi, J. Serafín-López et al. // Immunol. Invest. – 2012. – Vol. 41, N 2. – P. 144–156.
197. *Mycobacterium tuberculosis* promotes Th17 expansion via regulation of human dendritic cells toward a high CD14 and low IL-12p70 phenotype that reprograms upon exogenous IFN- $\gamma$  / J.N. Sondergaard, J.M. Laursen, L.B. Rosholm, S. Brix // Int. Immunol. – 2014. – Vol. 26, N 12. – P. 705–716.

198. *Mycobacterium tuberculosis* PstS1 amplifies IFN- $\gamma$  and induces IL-17/IL-22 responses by unrelated memory CD4<sup>+</sup> T cells via dendritic cell activation / C. Palma, G. Schiavoni, L. Abalsamo et al. // Eur. J. Immunol. – 2013. – Vol. 43, N 9. – P. 2386–2397.
199. *Mycobacterium tuberculosis* RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells / H.G. Choi, W.S. Kim, Y.W. Back et al. // Eur. J. Immunol. – 2015. – Vol. 45, N 7. – P. 1957–1971.
200. Nalbant, A. Genes associated with T helper 17 cell differentiation and function / A. Nalbant, D. Eskier // Front. Biosci. (Elite Ed). – 2016. – Vol. 8. – P. 427–435.
201. Natural killer T cells in pulmonary disorders / M. Rijavec, S. Volarevic, K. Osolnik et al. // Respir. Med. – 2011. – Vol. 105, N 51. – P. 520–525.
202. New drugs targeting Th2 lymphocytes in asthma / G. Caramori, D. Groneberg, K. Ito et al. // J. Occup. Med. Toxicol. – 2008. – Vol. 3, N 1. – P. 1–29.
203. NK1.1<sup>+</sup> cells and IL-22 regulate vaccine-induced protective immunity against challenge with *Mycobacterium tuberculosis* / R. Dhiman, S. Periasamy, P.F. Barnes et al. // J. Immunol. – 2012. – Vol. 189, N 2. – P. 897–905.
204. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor activated monocytes / H.G. Evans, T. Suddason, I. Jackson et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, N 43. – P. 17034–17039.
205. Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro: evaluating different polarizing factors / M.G. Hakemi, K. Ghaedi, A. Andalib et al. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. – 2011. – Vol. 47. – P. 581–592.
206. Peripherally induced Tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity / M. Yadav, S. Stephan, J.A. Bluestone // Front Immunol. – 2013. – Vol. 4. – P. 232.
207. Phenotypic and functional features of human Th17 cells / F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlasci et al. // JEM. – 2007. – Vol. 204, N 8. – P. 1849–1861.

208. PILAR is a novel modulator of human T-cell expansion / E. Huarte, J.R. Cubillos-Ruiz, Y.C. Nesbeth et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 12, N 4. – P. 1259–1268.
209. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases [Electronic resource] / N. Qu, M. Xu, I. Mizoguchi et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2013. – Vol. 2013. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/968549>.
210. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection / N. Pitabut, S. Sakurada, T. Tanaka et al. // *Int. J. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 10, N 8. – P. 1003–1014.
211. Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis / K. Matthews, K.A. Wilkinson, B. Kalsdorf et al. // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2011. – Vol. 91, N 6. – P. 587–593.
212. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis / E. Lazar-Molnar, B. Chen, K.A. Sweeney et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107, N 30. – P. 13402–13407.
213. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers / M. Mitsdoerffer, Y. Lee, A. Jäger et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107, N 32. – P. 14292–14297.
214. Pulmonary eosinophilia requires interleukin-5, eotaxin-1 and CD4<sup>+</sup> T-cells in mice immunized with respiratory syncytia virus G glycoprotein / T.R. Johnson, M.E. Rothenberg, B.S. Graham // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – Vol. 84, N 3. – P. 748–759.
215. Recombinant BCG  $\Delta$ ureC hly<sup>+</sup> induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses / C. Desel, A. Dorhoi, S. Bandermann et al. // *J. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 204, N 10. – P. 1573–1584.
216. Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4<sup>+</sup> T cells / X. Chen, M. Zhang, M. Liao et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 181, N. 7. – P. 734–742.

217. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor / W.W. Lee, S.W. Kang, J. Choi et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 115, N. 3. – P. 530–540.
218. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells / K. Hirota, H. Ahlfors, J.H. Duarte, B. Stockinger // *EMBO Rep.* – 2012. – Vol. 13, N. 2. – P. 113–120.
219. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells / G.J. Martinez, R.I. Nurieva, X.O. Yang, C. Dong // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1143, N. 6. – P. 188–211.
220. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease / W. Ouyang, S. Rutz, N.K. Crellin et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 71–109.
221. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27 [Electronic resource] / M. Xu, I. Mizoguchi, N. Morishima et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2010. – Vol. 2010. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946577>.
222. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21 / M.T. Wong, J.J. Ye, M.N. Alonso et al. // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 88, N. 6. – P. 624–631.
223. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production / E.C. Rosser, K. Oleinika, S. Tonon et al. // *Nat. Med.* – 2014. – Vol. 20, N. 11. – P. 1334–1339.
224. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function / S.Z. Josefowicz, L.F. Lu, A.Y. Rudensky // *Annu. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 531–564.
225. Role of chemokine ligand CCL20 and its receptor CCR6 in intestinal inflammation / W. Basheer, D. Kunde, R. Eri // *Immunology and Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 1, N. 2. – P. 30–37.
226. Sasindran, S.J. Mycobacterium tuberculosis infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium? [Electronic resource] /

- S.J. Sasindran, J.B. Torrelles // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol. 2, N 2. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109289/>.
227. Schwander, S. Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis* insights into pathogenesis and protection / S. Schwander, K. Dheda // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 183, N 6. – P. 696–707.
  228. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: an extended SEFIR domain is required for il-17RA-mediated signal transduction / R.M. Onishi, S.J. Park, W. Hanel et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N. 43. – P. 32751–32759.
  229. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells / Z. Chen, A. Laurence, Y. Kanno et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, N 21. – P. 8137–8142.
  230. Serum levels of selected Th17 and Th22 cytokines in psoriatic patients / A. Michalak-Stoma, J. Bartosińska, M. Kowal et al. // *Disease Markers.* – 2013. – Vol. 35, N. 6. – P. 625–631.
  231. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells / X.O. Yang, A.D. Panopoulos, R. Nurieva et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, N 13. – P. 9358–9363.
  232. Steinman, L.A. A brief history of T(H)17 the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T-cell mediated tissue damage / L.A. Steinman // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 139–145.
  233. StIL-17 gene polymorphisms in the development of pulmonary tuberculosis / J. Du, J. Han, X. Li et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8, N 3. – P. 3225–3229.
  234. Structure of the unique SEFIR domain from human interleukin 17 receptor A reveals a composite ligand-binding site containing a conserved  $\alpha$ -helix for Act1 binding and IL-17 signaling / B. Zhang, C. Liu, W. Qian et al. // *Acta Cryst.* – 2014. – Vol. 70, N 5. – P. 1476–1483.
  235. Sundareshan, V. *Mycobacteria and Biological Response Modifiers: Two Sides of the Relationship* / V. Sundareshan, J. Modi, N.M. Khardori // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2011. – Vol. 25. – P. 865–893.

236. Szabo, A. Collaboration of Toll-like and Rig-I-like receptors in human dendritic cells: triggering antiviral innate immune responses / A. Szabo, E. Rajnavolgyi // *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 16, N. 2(3). – P. 195–207.
237. T helper 17 cells interplay with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in regulation of inflammations and autoimmune diseases / J. Mai, H. Wang, X.-F. Yang // *Front. Biosci.* – 2010. – Vol. 15, N 3. – P. 986–1006.
238. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptor ROR alpha and ROR gamma / X.O. Yang, B.P. Pappu, R. Nurieva et al. // *Immunity.* – 2008. – Vol. 28, N 1. – P. 29–39.
239. T regulatory cells and immune activation in *Mycobacterium tuberculosis* infection and the effect of preventive therapy / I. Wergeland, J. Assmus, A.M. Dyrhol-Riise // *Scand. J. Immunol.* – 2011. – Vol. 73, N. 3. – P. 234–242.
240. T regulatory cells and Th1/Th 2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients / X.-Y. He, L. Xiao, H.-B. Chen et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 29, N 6. – P. 643–650.
241. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements [Electronic resource] / A. Kanhere, A. Hertweck, U. Bhatia et al. // *Nat. Commun.* – 2012. – Vol. 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535338/>.
242. Takatsu, K. IL-5 and eosinophilia / K. Takatsu, H. Nakajima // *J. Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20, N 3. – P. 288–294.
243. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu // *J. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci.* – 2011. – Vol. 87, N 8. – P. 463–485.
244. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins / M. Veldhoen, K. Hirota, A.M. Westendorf et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 453, N 7191. – P. 106–109.
245. The changes and its significance of Th17 and Treg cells and related cytokines in patients with tuberculosis pleurisy [Electronic resource] / G.Q. Wang, C.L. Yang, D.F. Yue et al. // *Allergy Asthma Clin Immunol.* – 2014. – Vol. 10, N 1. – URL: <http://www.aacijournal.com/content/10/1/28>.



246. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and Th-17 cells / A.T Bauquet, H. Jin, A.M. Paterson et al. // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol. 10, N 2. – P. 167–175.
247. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease / S. Leung, X. Liu, L. Fang et al. // *Cell. Mol. Immunol.* – 2010. – Vol. 7, N 3. – P. 182–189.
248. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function / W.J. O'Connor, L.A. Zenewicz, R.A. Flavell // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11, N 6. – P. 471–476.
249. The functional plasticity of T cell subsets / J. Bluestone, C. Mackay, J. O'Shea, B. Stockinger // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 9, N 11. – P. 811–816.
250. The IL-6/IL-6R/sgp130 system and Th17 associated cytokines in patients with gestational diabetes / M. Kuźmicki, B. Telejko, D. Lipińska et al. // *Endokrynol. Pol.* – 2014. – Vol. 65, N 3. – P. 169–175.
251. The isolation and expansion of gamma delta T cells in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid / C.Q. Li, Y.J. Xu, S.X. Chen et al. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* – 2004. – Vol. 20, N 3. – P. 337–339.
252. The role of interleukin-23 in stability of in vitro T helper-17 cells / M. Taherian, A.R. Razavi, M. Izad et al. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* – 2014. – Vol. 13, N 2. – P. 131–137.
253. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease / B. Afzali, G. Lombardi, R.I. Lecher, G.M. Lord // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – Vol. 148. – P. 32–46.
254. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation / J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann et al. // *Gut.* – 2009. – Vol. 58, N 9. – P. 1207–1217.
255. Theoretical-Scientific Foundations about the Use of Low-Dose in Oncology / M. Fioranelli, M. Bianchi, M.G. Roccia // *Interdiscip. J. Microinflammation.* – 2014. – Vol. 1, N 2. – P. 1–2.

256. Th17 cells and mucosal host defense / S.J. Aujla, P.J. Dubin, J.K. Kolls // *Semin. Immunol.* – 2007. – Vol. 19, N 6. – P. 377–382.
257. Th17 cells in autoimmune and infectious diseases [Electronic resource] / J.F. Zambrano-Zaragoza, E.J. Romo-Martinez, M. de J. Durán-Avelar et al. // *Int. J. Inflam.* – 2014. – Vol. 2014. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/651503>.
258. Th17 cells in autoimmunity and immunodeficiency: protective or pathogenic? / A.K. Marwaha, N.J. Leung, A.N. McMurchy, M.K. Levings // *Frontiers in Immunology.* – 2012. – Vol. 3, N 129. – P. 1–8.
259. Th17 cells in immunity and autoimmunity [Electronic resource] / S.K. Bedoya, B. Lam, K. Lau, J. Larkin III // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2013. – Vol. 2013. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/986789>.
260. Th17 cells in human disease / L.A. Tesmer., K. Lundy, S. Sarkar, D.A. Fox // *Immunological Reviews.* – 2008. – Vol. 223, N 1. – P. 87–113.
261. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria / R. Basu, D.B. O'Quinn, D.J. Silberger et al. // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 1061–1075.
262. Th9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells / K. Gerlach, Y.Y. Hwang, A. Nikolaev et al. // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15, N 7. – P. 676–686.
263. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk / J. Brown, H. Wang, G.N. Hajishengallis et al. // *Journal of Dental Research.* – 2011. – Vol. 90, N 4. – P. 417–427.
264. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by  $\beta$ -defensin 2 / A. Biragyn, P.A. Ruffini, C.A. Leifer et al. // *Science.* – 2002. – Vol. 298, N 10. – P. 1025–1029.
265. Tong, Z.H. Subpopulations of helper T lymphocytes in tuberculous pleurisy / Z.H. Tong, H.Z. Shi // *Tuberculosis (Edinb).* – 2013. – Vol. 93, N 3. – P. 279–284.

266. Torchinsky, M.B. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger / M.B. Torchinsky, J.M. Blander // Cell. Mol. Life Sci. – 2010. – Vol. 67, N 9. – P. 1407–1421.
267. Transcription factor c-Maf mediates the TGF- $\beta$ -dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells / S. Rutz, R. Noubade, C. Eidenschenk et al. // Nat. Immunol. – 2011. – Vol. 12, N 12. – P. 1238–1245.
268. Transcription of IL-17 and IL-17f is controlled by conserved noncoding sequence 2 / X. Wang, Y. Zhang, X.O. Yang et al. // Immunity. – 2012. – Vol. 36, N 1. – P. 23–31.
269. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune responses / M.O. Li, Y.Y. Wan, S. Sanjabi et al. // Annu. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 24. – P. 99–146.
270. Transforming growth factor-beta «reprograms» the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset / M. Veldhoen, C. Uyttenhove, J. van Snick et al. // Nat. Immunol. – 2008. – Vol. 9, N 12. – P. 1341–1346.
271. Vernal, R. Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection / R. Vernal, J.A. Garcia-Sanz // Infect. Disord. Drug Targets. – 2008. – Vol. 8, N 4. – P. 207–220.
272. Vignali, D.A. IL-12 family cytokines: immunological playmakers / D.A. Vignali, V.K. Kuchroo // Nat. Immunol. – 2012. – Vol. 13, N 8. – P. 722–728.
273. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis / H.M. Vordermeier, B. Villarreal-Ramos, P.J. Cockle et al. // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, N 8. – P. 3364–3373.
274. Waite, J.C. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases / J.C. Waite, D. Skokos [Electronic resource] // Int. J. Inflam. – 2012. – Vol. 2012. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/819467>.
275. Weaver, C.T. Interplay between the Th17 and Treg cell lineages: a (co)evolutionary perspective / C.T. Weaver, R.D. Hutton // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 9, N 12. – P. 883–889.

276. Wong, K.W. Postprimary tuberculosis and macrophage necrosis: is there a big ConNEction? / K.W. Wong, Jr. W.R. Jacobs // MBio. – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. e01589-15.
277. Wood, K. Interferon-gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T-cells in vivo / K. Wood, B. Sawitzki // Trends Immunol. – 2006. – Vol. 27, N 4. – P. 183–187.