

УДК 615.373:616.24-002.5

**СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**О.И. Уразова¹, И.Е. Есимова¹, М.С. Игнатова¹,
В.В. Новицкий^{1,2}, О.В. Филинюк¹¹ Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск² Томский государственный университет
E-mail: urazova72@yandex.ru, orevi@mail.ru,
marisabel4603@yandex.ru**Уразова Ольга Ивановна**,
д-р мед. наук, профессор, про-
фессор кафедры патофизиологи-
и СибГМУ.

E-mail: urazova72@yandex.ru

Есимова Ирина Евгеньевна,
канд. мед. наук, докторант
кафедры патофизиологии
СибГМУ.

E-mail: orevi@mail.ru

Игнатова Мария Сергеевна,
аспирант кафедры патофизи-
ологии СибГМУ.

E-mail:

marisabel4603@yandex.ru

**Новицкий Вячеслав Викто-
рович**, д-р мед. наук, профес-
сор, академик Российской ака-
демии наук, зав. кафедрой па-
тофизиологии СибГМУ, стар.
науч. сотр. лаборатории моде-
лирования физических процес-
сов в биологии и медицине фи-
зического факультета ТГУ.

E-mail: patfizssmu@yandex.ru

**Филинюк Ольга Владими-
ровна**, д-р мед. наук, доцент,
заведующая кафедрой фтизи-
атрии и пульмонологии
СибГМУ.

E-mail: danil@mail.tomsknet.ru

Целью работы явилось исследование молекулярных патогенетических факторов дисрегуляции активации синтеза и секреции IFN- γ Т-лимфоцитами при туберкулезе легких (ТЛ) на этапе IL-12/IL-27-опосредованной сигнальной трансдукции. Обследовано 97 больных с инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым (ЛУ) туберкулезом легких. Использованы методы моделирования *in vitro* IL-12/IL-27-зависимой активации Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 (Th1), иммуноферментный анализ, проточная цитометрия. Показано, что при туберкулезе легких спонтанная и IL-12/IL-27-индуцированная *in vitro* гиперсекреция IFN- γ – ключевого цитокина Th1-ассоциированного иммунного ответа – сочетается с уменьшением общего количества CD3⁺ Т-лимфоцитов и числа CD3⁺ Т-клеток с внутриклеточным содержанием IFN- γ (CD3⁺IFN- γ ⁺) и транскрипционного фактора T-bet (CD3⁺T-bet⁺) при увеличении количества IFN- γ ⁺ CD3-негативных лимфоцитов. Максимально выраженный дефицит CD3⁺IFN- γ ⁺ и CD3⁺T-bet⁺ клеток отмечен при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких. Продемонстрировано, что при туберкулезе легких независимо от клинической формы заболевания в лимфоцитах обнаруживается дефицит тирозиновых киназ (JAK1, JAK2, TYK2) и транскрипционных факторов (STAT1, STAT4), что препятствует реализации внутриклеточного каскада IL-12/IL-27-зависимых реакций, а следовательно, опосредует дисрегуляцию иммунного ответа уже на этапе активации и диф-

ференцировки Т-лимфоцитов. Сочетание гиперсекреции IFN- γ *in vitro* с указанными изменениями позволяет заключить, что она не связана с активацией Т-лимфоцитов.

Ключевые слова:

Т-лимфоциты, интерферон, внутриклеточный сигналинг, транскрипционные факторы, тирозинные киназы, туберкулез легких.

В основе патогенеза распространенного деструктивного туберкулеза лежит дисрегуляция антигенспецифического иммунного ответа, опосредованного активацией, пролиферацией и дифференцировкой Т-лимфоцитов-хелперов типа 1 (Th1) [1–3]. Однако по-прежнему остается открытым вопрос о том, включение каких механизмов иммунного ответа на возбудитель и на каком его этапе способствует возникновению «иммунной девиации» и патологическому прогрессирующему течению туберкулезной инфекции. Одной из причин снижения активности (гипо- и анергии) Т-клеток и патологии противотуберкулезного иммунитета могут быть нарушения взаимодействия между Т-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками [4]. Межклеточная сигнализация в иммунной системе осуществляется путем как непосредственного контактного взаимодействия клеток, в котором участвуют их поверхностные молекулы, так и

посредством цитокинов, одним из которых является IFN- γ – ключевой цитокин противотуберкулезного иммунитета [3, 5, 6]. Способность цитокинов регулировать клеточные функции обусловлена тем, что после их взаимодействия с комплементарными рецепторами на поверхности клеток сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены [5, 6]. По сути, само по себе наличие цитокина не обеспечивает клеточный ответ. Ввиду недостаточности (слабости) «внешнего» сигнала клетка использует так называемые каскадные механизмы его усиления. Учитывая, что механизм сигнальной трансдукции является сложным комплексным процессом, при котором нарушения могут присутствовать в различных его звеньях, вопрос о существовании внутриклеточных механизмов, приводящих к дисфункции иммунокомпетентных клеток при туберкулезе, в настоящее время остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: охарактеризовать роль нарушений сигнальной трансдукции (сигнального JAK-STAT-пути) в дисрегуляции активации Т-лимфоцитов цитокинами индуктивной фазы противотуберкулезного иммунного ответа (IL-12 и IL-27) у больных с различными клинико-патогенетическими вариантами туберкулеза легких (ТЛ).

Материал и методы. Обследовано 97 больных (75 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 20 до 55 лет с впервые выявленным инфильтративным (48 (49,48 %) человек) и диссеминированным (49 (50,52 %) человек) туберкулезом легких (ТЛ). Больные ТЛ находились на стационарном лечении в ОГБУЗ «Томская областная клиническая туберкулезная больница». Диагноз ТЛ основывался на данных анамнеза, рентгенологического обследования, бактериологического и микроскопического исследования мокроты, анализа клинической картины.

Исследования проводились до начала больным ТЛ этиотропной химиотерапии. Критериями исключения больных ТЛ из исследования считались: возраст младше 20 и старше 55 лет; наличие других (кроме инфильтративной и диссеминированной) клинических форм туберкулезной инфекции; наличие аллергии и сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза в стадии обострения; терапия глюкокортикоидами и иммуномодулирующими препаратами; у женщин исключалась беременность.

При проведении исследований учитывалась лекарственная чувствительность возбудителя (*M. tuberculosis*). Всего был обследован 51 (52,58 %) пациент с лекарственно-чувствительным ТЛ (ЛЧТЛ) и 46 (47,42 %) пациентов с лекарственно-устойчивым ТЛ (ЛУТЛ).

В контрольную группу вошли 35 практически здоровых мужчин и женщин с сопоставимым больным ТЛ распределением по полу и возрасту.

Эксперименты *in vitro* выполнялись в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

В работе исследовались лимфоциты крови, взятой утром натощак из локтевой вены.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови осуществляли методом градиентного центрифугирования ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Лимфоциты отделяли от моноцитов на основе способности последних прилипать к пластику.

Подсчет количества лимфоцитов в суспензии осуществляли общепринятыми методами. Жизнеспособность клеток оценивали посредством теста с трипановым синим. Жизнеспособность лимфоцитов была не менее 95 %.

Специфическую цитокиновую индукцию лимфоцитов осуществляли путем добавления в культуральную среду индукторов Th1-иммунного ответа (рекомбинантных цитокинов IL-12 и IL-27 (eBioscience Company, США) в дозе 20 и 10 нг/мл) и блокатора внутриклеточного транспорта мөнненина (Sigma, США) (5 мкг/мл). Время инкубации с индукторами варьировало от 1 до 48 ч в зависимости от тестируемого параметра.

Для определения содержания в лимфоцитах активных (фосфорилированных) форм транскрипционных факторов STAT1, STAT4 и тирозинкиназ JAK1, JAK2, TYK2 готовили клеточные лизаты с использованием лизирующего буфера (протокол Cell Signaling Technology, США).

Для оценки содержания IFN- γ в базальной и цитокин-индуцированной культуральной среде (оценка секреции IFN- γ), определения содержания активных форм STAT1, STAT4 и JAK1, JAK2, TYK2 в лизатах лимфоцитов использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» анализ, согласно методическим рекомендациям производителя (Cusabio

Biotech, США). Для регистрации результатов использовали фотометр Multiscan EX (Thermo, Финляндия).

Для определения содержания IFN- γ (оценка синтеза IFN- γ) и активной формы фактора транскрипции T-bet непосредственно в Т-лимфоцитах применяли метод проточной цитометрии (проточный цитофлуориметр «FACS Calibur Flow cytometr BD», Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител, обработанных флуоресцентными метками (FITC, PE, PerCP) (R&D Systems, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows фирмы Statsoft Inc. Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Аспина – Уэлча. Для оценки статистической значимости отличий между независимыми выборками с равными дисперсиями использовали непараметрический критерий Манна – Уитни, при различных дисперсиях – критерий Уолда – Вольфовита.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных в работе данных показал, что у больных инфильтративным и диссеминированным ТЛ на фоне дефицита Т-лимфоцитов в крови секреция IFN- γ *in vitro* – базальная и IL-12/IL-27-индуцированная, не снижается, а напротив, увеличивается при наибольшей выраженности изменений при диссеминированном ЛУТЛ (табл. 1).

Таблица 1. Секреция IFN- γ лимфоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких, Ме (Q₁–Q₃)

Группы обследованных лиц		Базальная секреция, пг/мл	IL-12/IL-27-индуцированная секреция, пг/мл
Здоровые доноры		33,11 (17,94–40,15)	65,30 (59,28–85,34) $p_4 < 0,001$
Больные инфильтративным туберкулезом легких	ЛЧ	87,45 (47,54–106,00) $p_1 < 0,001$	194,65 (150,22–259,32) $p_1 < 0,001$; $p_4 < 0,001$
	ЛУ	96,85 (61,40–114,50) $p_1 < 0,001$	202,18 (170,10–248,11) $p_1 < 0,001$; $p_4 < 0,001$
Больные диссеминированным туберкулезом легких	ЛЧ	93,71 (68,18–121,41) $p_1 < 0,001$	254,60 (216,17–298,63) $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,05$; $p_4 < 0,001$
	ЛУ	101,47 (68,66–127,12) $p_1 < 0,001$	305,38 (201,43–373,02) $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,05$; $p_4 < 0,001$

Примечание (здесь и далее): ЛЧ – лекарственно-чувствительный; ЛУ – лекарственно-устойчивый; p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p_2 – у больных с инфильтративным ТЛ; p_4 – с показателями базальной секреции цитокина.

Одной из вероятных причин этого могла быть активация Т-клеток посредством внутриклеточной трансдукции сигналов с поверхностных рецепторов, стимулирующих лимфоциты к интерферонпродукции [7].

Однако в опровержение этому было показано, что во всех группах больных ТЛ, независимо от клинической его формы и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (ППП), содержание в лимфоцитах активных (фосфорилированных, p-) форм тирозинкиназ и факторов транскрипции JAK-STAT-сигналинга (p-JAK1, p-JAK2, p-TYK2, p-STAT1, p-STAT4) (табл. 2), равно как и транскрипционного фактора T-bet в Т-клетках, оказалось существенно ниже, чем у здоровых доноров.

Таблица 2. Содержание киназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лимфоцитах после IL-12/IL-27-индукции *in vitro* у больных туберкулезом легких, Me (Q₁–Q₃)

Показатель	Группы обследованных лиц				
	Здоровые доноры	Инфильтративный ТЛ		Диссеминированный ТЛ	
		ЛЧ	ЛУ	ЛЧ	ЛУ
p-JAK1, пг/мл	20,90 (20,19–21,80)	17,75 (17,30–19,76) p ₁ < 0,05	16,31 (15,70–16,86) p ₁ < 0,05	18,76 (17,10–19,48) p ₁ < 0,05	15,44 (15,12–16,90) p ₁ < 0,05
p-JAK2, пг/мл	18,63 (17,30–18,96)	15,22 (15,03–16,40) p ₁ < 0,05	14,95 (13,71–16,42) p ₁ < 0,05	16,62 (15,73–17,48) p ₁ < 0,05	14,03 (13,20–14,51) p ₁ < 0,05
p-TYK2, пг/мл	20,92 (18,91–23,33)	13,26 (12,80–15,00) p ₁ < 0,01	12,60 (12,10–12,83) p ₁ < 0,001	14,14 (13,80–14,75) p ₁ < 0,01	12,04 (11,62–14,73) p ₁ < 0,001
p-STAT1, пг/мл	46,55 (31,81–55,54)	29,43 (24,78–40,53) p ₁ < 0,01	20,02 (19,64–21,45) p ₁ < 0,001 p ₃ < 0,01	22,20 (20,11–30,89) p ₁ < 0,001	20,26 (19,87–29,96) p ₁ < 0,001
p-STAT4, пг/мл	24,56 (17,93–30,01)	19,65 (13,71–22,92) p ₁ < 0,05	16,75 (12,74–18,55) p ₁ < 0,01	19,70 (14,81–20,35) p ₁ < 0,05	11,07 (10,10–16,92) p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,01

Примечание: p₃ – у больных ЛЧТЛ (внутри каждой клинической формы)

Возможно, это связано с гипоекспрессией на поверхности Т-лимфоцитов рецепторов к IL-12 и IL-27 либо аномалией данных рецепторов, вследствие чего клетки не активируются и внутриклеточный каскад реакций, направленных на индукцию генов дифференцировки и синтеза IFN- γ в клетках, не запускается [8, 9, 10].

Действительно, в результате анализа IFN- γ -синтетической функции Т-клеток у больных ТЛ было выявлено снижение численности CD3⁺IFN- γ ⁺ и CD3⁺T-bet⁺ Т-лимфоцитов на фоне увеличения количества CD3⁺IFN- γ ⁺ и CD3⁺T-bet⁺ клеток. Наиболее выраженными данные изменения были у больных диссеминированным ЛУТЛ.

Заключение. Учитывая, что увеличение секреции IFN- γ *in vitro* у больных ТЛ сочетается с дефицитом CD3⁺IFN- γ ⁺ и CD3⁺T-bet⁺ Т-лимфоцитов и снижением содержания активных компонентов внутриклеточного JAK-STAT-сигнального пути, обуславливающих активацию, дифференцировку и IFN- γ -синтетическую активность Т-клеток, следует полагать, что гиперсекреция IFN- γ при ТЛ опосредована не Th1-клетками, а лимфоцитами других субпопуляций, в частности NK-клеток (натуральных или естественных киллеров). В пользу это свидетельствует увеличение у больных ТЛ содержания CD3⁺IFN- γ ⁺ и CD3⁺T-bet⁺ лимфоцитов в крови.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (НШ-4184.2014.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иммунопатология туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. – Томск: Изд-во Томского университета, 2007. – 194 с.
2. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунитета / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 3. – С. 79–86.
3. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, еолопроктологии. – 2008. – № 4. – С. 4–13.
4. Чернушенко Е.Ф., Процюк Р.Г. Противотуберкулезный иммунитет (Часть I) // Украинский пульмонологический журнал. – 2010. – № 4. – С. 53–58.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.

6. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
7. Минеев В.Н. Экспрессия транскрипционного фактора T-bet в мононуклеарах периферической крови при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1/2. – С. 169–173.
8. McAleer P.J., Saris C.J., Vella A.T. The WSX-1 pathway restrains intestinal T-cell immunity // Int. Immunol. – 2011. – V. 23 (2). – P. 129–137.
9. Silver J.S., Hunter C.A. Gp130 at the Nexus of Inflammation, Autoimmunity, and Cancer // Journal of leukocyte biology. – 2010. – V.88 (6). – P. 1145–1156.
10. WSX-1 over-expression in CD4(+) T cells leads to hyperproliferation and cytokine hyperproduction in response to TCR stimulation / A. Takeda, S. Hamano, H. Shiraishi et al. // Int. Immunol. – 2005. – V. 17 (7). – P. 889–897.

Поступила 10.11.2014.