

СЕКРЕЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ IL-12, IL-27 МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ И ЭКСПРЕССИЯ ИХ РЕЦЕПТОРОВ НА Т-ЛИМФОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ НАПРАВЛЕННОЙ ИНДУКЦИИ КЛЕТОК *IN VITRO* ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В.,
Хасанова Р.Р., Филинчук О.В.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования у больных туберкулезом легких секреции цитокинов семейства интерлейкина (IL) 12 – IL-12p70, IL-12p40, IL-12p35 и IL-27 мононуклеарными лейкоцитами крови и экспрессии комплементарных им рецепторов на Т-лимфоцитах в условиях направленной (антиген- и цитокин-опосредованной соответственно) индукции клеток *in vitro*. У больных туберкулезом легких установлено угнетение спонтанной и VCG-индуцированной секреции IL-12p70 и IL-12p35 на фоне гиперпродукции IL-12p40 и IL-27, снижение относительного количества CD3⁺gp130⁺, CD3⁺IL12Rβ2⁺ лимфоцитов и увеличение содержания Т-клеток с высокой экспрессией ингибиторной молекулы WSX-1 (CD3⁺WSX-1^{hi}) при IL-12/IL-27-индукции *in vitro*. Показано, что выявленные изменения в большинстве случаев носят однонаправленный характер и варьируют в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя инфекции к противотуберкулезным препаратам.

Ключевые слова: интерлейкины, IL-12, IL-27, рецепторы к интерлейкинам, Т-лимфоциты, туберкулез легких

Адрес для переписки:

Есимова Ирина Евгеньевна
к.м.н., докторант кафедры
патологии ГБОУ ВПО «Сибирский
государственный медицинский
университет»
634009, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 229,
кв. 80.
Тел.: 8 (906) 199-15-73.
E-mail: orevi@mail.ru

Авторы:

Есимова И.Е. – к.м.н., докторант кафедры
патологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет», г. Томск, Россия
Уразова О.И. – д.м.н., профессор, профессор кафедры
патологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет», г. Томск, Россия
Новицкий В.В. – д.м.н., профессор, академик РАН,
заведующий кафедрой патологии ГБОУ ВПО
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский
университет», г. Томск, Россия
Хасанова Р.Р. – к.м.н., докторант кафедры
патологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный
медицинский университет», г. Томск, Россия
Филинчук О.В. – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой
фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО «Сибирский
государственный медицинский университет», г. Томск,
Россия

Поступила 20.09.2013

Принята к печати 18.10.2013

SECRETION OF IL-12, IL-27 BY MONONUCLEAR LEUKOCYTES AND EXPRESSION OF THEIR RECEPTORS ON T-LYMPHOCYTES IN CONDITIONS OF DIRECTED CELL INDUCTION *IN VITRO* IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Esimova I.E., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Khasanova R.R.,
Filinyuk O.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of studies concerning secretion of cytokines belonging to interleukin 12 family, i.e., IL-12p70, IL-12p40, IL-12p35 and IL-27 in mononuclear blood leukocytes, as well as expression of their specific receptors on T-lymphocytes from tuberculosis patients under the *in vitro* conditions of directed (resp., antigen- and cytokine-mediated) cell induction. In patients with pulmonary TB, we have registered suppression of both spontaneous and BCG-induced secretion of IL-12p70 and IL-12p35, along with overproduction of IL-12p40 and IL-27. Furthermore, a decrease in relative contents of CD3⁺gp130⁺, CD3⁺IL12Rβ2⁺ lymphocytes were revealed in the *in vitro* IL-12/IL-27 induction tests, as well as increased concentration of T-cells with high expression of the inhibitory molecule WSX-1 (CD3⁺WSX-1^{hi}). It was shown that the detectable changes are unidirectional in most cases, being dependent on clinical form of the disease and sensitivity of the etiological agent to anti-tuberculosis drugs. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 3, pp 237-246)

Keywords: interleukins, IL-12, IL-27, interleukin receptors, T lymphocytes, pulmonary tuberculosis

Address for correspondence:

Esimova Irina E.
PhD, Doctoral Candidate, Department of
Pathophysiology, Siberian State Medical University
634009, Russian Federation, Tomsk, Lenin pr., 229,
apt 80.
Phone: 7 (906) 199-15-73.
E-mail: orevi@mail.ru

Authors:

Esimova I.E., PhD (Medicine), Doctoral Candidate,
Department of Pathophysiology, Siberian State Medical
University, Tomsk, Russian Federation
Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor,
Department of pathophysiology, Siberian State Medical
University, Tomsk, Russian Federation
Novitskiy V.V., PhD, MD (Medicine), Full Member,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian
Federation
Khasanova R.R., PhD (Medicine), Doctoral
Candidate, Department of Pathophysiology, Siberian
State Medical University, Tomsk, Russian Federation
Filinyuk O.V., PhD, MD (Medicine), Associate
Professor, Chief, Department of Phthisiology and
Pulmonology, Siberian State Medical University,
Tomsk, Russian Federation

Received 20.09.2013

Accepted 18.10.2013

Введение

Несмотря на успехи современной медицины, туберкулез легких (ТЛ) по-прежнему занимает одну из лидирующих позиций среди социально значимых заболеваний. Не вызывает сомнений, что патогенез туберкулезной инфекции обусловлен, с одной стороны, изменением биологических свойств возбудителя инфекции и увеличением доли штаммов *M. tuberculosis*, обладающих устойчивостью к препаратам этиотропной терапии, с другой стороны – дисфункцией иммунной системы. Именно дисрегуляции иммунитета при ТЛ в последнее время уделяется особое внимание. Данный интерес связан с понятием вторичной иммунологической недостаточности, сопровождающей течение ТЛ, и поисками путей ее коррекции при данном заболевании [2, 11, 19].

Как уже установлено, эффективным в борьбе с *M. tuberculosis* является запуск клеточно-опосредованного иммунного ответа с активацией Т-лимфоцитов-хелперов типа 0 (Th0 или наивных), дифференцирующихся в Т-лимфоциты-хелперы типа 1 (Th1). Следовательно, от реакции Т-клеток во многом зависит результат формируемого против *M. tuberculosis* иммунного ответа. На данный момент выделяют два магистральных пути созревания и активации Th1-лимфоцитов. Первый из путей (рецептор-опосредованный) реализуется через Т-клеточный рецептор при непосредственном контактом взаимодействии иммунокомпетентных клеток; второй – опосредованно через цитокины, продуцируемые антигенпрезентирующей клеткой (АРС), а на более поздних этапах иммунного ответа и самими Th1-лимфоцитами [3, 4, 11].

Среди причин, приводящих к нарушению цитокин-опосредованной активации Т-клеток, в первую очередь, рассматривают дисфункцию АРС, продуцирующих Th1-активирующие цитокины, а также нарушение экспрессии основных рецепторных молекул к данным цитокинам на Т-клетках.

Известно, что основными индукторами цитокин-опосредованной активации Т-лимфоцитов являются интерлейкины (IL) – IL-12 и IL-27, синтез которых обусловлен активацией АРС в ответ на инфектоген. Активный гетеродимер IL-12p70 в своем строении имеет две гликозилированные субъединицы – p40 и p35. При этом субъединица IL-12p35 имеет решающее значение для проведения сигнала внутрь Т-лимфоцита и запуска процессов, способствующих дифференцировке наивных Т-клеток в Th1, а субъединица IL-12p40 участвует в связывании цитокина со специфическим рецептором. Активность обеих субъеди-

ниц проявляется только при одновременном их синтезе в иммунокомпетентной клетке, т.е. при формировании биологически активной молекулы цитокина – IL-12p70 [4, 17, 25]. Рецептор для IL-12p70 также состоит из двух субъединиц – IL-12R β 1 и IL-12R β 2. Однако на покоящихся Т-лимфоцитах рецептор к IL-12p70 конституционно представлен только одной субъединицей (β 1), что снижает его сродство к стимулирующим сигналам IL-12p70. Цитокином, индуцирующим экспрессию IL-12R β 2-субъединицы рецептора к IL-12 на Т-лимфоцитах, является IL-27 [4, 7, 12, 13, 24]. IL-27, как и IL-12p70, состоит из двух субъединиц (EBI3 и IL-27p28) и является лигандом для WSX-1/gp130-рецептора Т-клеток. Т-клеточный цитокиновый рецептор (WSX-1, TCCR) относится к цитокиновым рецепторам типа 1 и имеет гомологию с gp130-молекулой, образуя с последней функциональный рецепторный комплекс, обладающий способностью передавать активационный сигнал после его связывания с IL-27 [4, 24].

Вместе с тем сведения, касающиеся механизмов нарушений цитокин-опосредованного пути активации Т-клеток при ТЛ, носят нечеткий, несистематизированный, а порою и противоречивый характер, что не позволяет однозначно оценить наличие и направленность патологических изменений, приводящих к нарушению активации Th1-лимфоцитов и противотуберкулезного иммунного ответа в целом.

В свете вышеизложенного **целью настоящего исследования** явился анализ цитокинсекреторной (IL-12p70, IL-12p35, IL-12p40, IL-27) активности мононуклеарных лейкоцитов крови и экспрессии на Т-клетках специфических рецепторных молекул к данным цитокинам (IL-12R β 2, WSX-1, gp130) в условиях направленной индукции клеток *in vitro* у больных ТЛ.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 107 пациентов (87 мужчин и 20 женщин) с впервые выявленным распространенным ТЛ в возрасте 20-55 лет, которые были разделены на 4 группы с учетом клинической формы заболевания (инфильтративный, диссеминированный) и устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам (лекарственно-чувствительный [ЛЧ], лекарственно-устойчивый [ЛУ] ТЛ).

Диагноз ТЛ и его форма устанавливались на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. В исследование не включались:

больные, получавшие терапию глюкокортикостероидами и нестероидными противовоспалительными препаратами на момент исследования; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкопатология, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми заболеваниями (гломерулонефрит, ревматоидный артрит, гепатит, ВИЧ-инфекция); больные, которым была назначена иммунотерапия.

Контрольную группу составили 50 практически здоровых добровольцев с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, не имеющие в анамнезе легочной патологии, тяжелых аллергических реакций, хронических инфекционных заболеваний, а также патологических изменений в легких (по данным флюорографического исследования). Частота заболеваемости острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями у лиц контрольной группы не превышала 3 раз в год.

Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты (смешанная культура клеток) и лимфоциты, полученные из венозной гепаринизированной (25 ед/мл) крови, взятой утром натощак из локтевой вены у больных ТЛ и здоровых добровольцев. Для исследования цитокинсекреторной активности клеток использовали смешанную культуру мононуклеарных лейкоцитов, для изучения экспрессии рецепторов к цитокинам на поверхности Т-клеток – культуру лимфоцитов. Выделение мононуклеарных клеток из крови проводили стандартно, на градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³). Выделение лимфоцитов осуществляли из смешанной культуры мононуклеарных клеток методом адгезии к пластику. Идентифицировали клетки путем витальной окраски азур II-эозином. Жизнеспособность выделенных клеток (по данным трипанового теста) составляла не менее 97%.

Культивирование полученных клеточных суспензий (мононуклеарные лейкоциты, лимфоциты) осуществляли в полной питательной среде по методу Е.Д. Гольдберга и соавт. [1992] в СО₂-инкубаторе в течение 48 ч без и с добавлением в культуру клеток специфических индукторов. Специфическую стимуляцию клеток для оценки их цитокинсекреторной активности проводили в смешанной культуре мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* в присутствии вакцинного штамма BCG (ФГУП «НПО Микроген», Россия) в дозе 50 мкг/мл. Исследование экспрессии рецепторов к цитокинам на поверхности Т-клеток проводили в культуре лимфоцитов, прошедших культивирование в присутствии рекомбинантных интерлейкинов IL-12 и IL-27 (eBioscience

Company, США) в дозах 20 и 10 нг/мл соответственно.

Процедуру окрашивания поверхностных молекул (CD3, IL-12R β 2, WSX-1, gp130) лимфоцитов, включающую в себя этапы Fc-блокировки, фиксации, пермеабелизации и окрашивания клеток специфическими моноклональными антителами, проводили согласно протоколам фирмы производителя (R&D Systems, США). Исследование осуществляли методом двухцветной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием изотипических контролей (R&D Systems, США).

Уровень базальной и BCG-индуцированной секреции интерлейкинов (IL-12p70, IL-12p35, IL-12p40, IL-27) в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с методическим рекомендациям фирмы-производителя (eBioscience Company, США). Регистрацию оптической плотности содержимого ячеек планшета проводили на фотометре Multiscan EX (Thermo, Финляндия) при длине волны 450 нм. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного пакета Multiskan Magic. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

Обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы Statsoft Inc. Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовали тест Шапиро–Вилка; для проверки гипотезы о равенстве генеральных дисперсий анализируемых выборок – критерий Фишера. Поскольку исследованные количественные признаки в группах сравнения не подчинялись нормальному распределению, для оценки статистических значимых отличий между независимыми выборками с ненормальным распределением и равными дисперсиями использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, при различных дисперсиях – критерий Уолда–Вольфовита. Для сравнения зависимых групп использовали критерий Вилкоксона. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах вычисляли медиану, 25% и 75% квартили. При уровне значимости $p < 0,05$ различие двух сравниваемых величин считали достоверным.

Результаты

В ходе проведенного исследования было установлено увеличение спонтанной секреции IL-27 во всех группах обследуемых лиц по сравнению

с показателями в группе контроля, наиболее выраженное при инфильтративном ЛЧТЛ (табл. 1). BCG-индукция клеток *in vitro* вызывала усиление секреции IL-27 относительно ее спонтанной продукции, а также по сравнению с показателями у здоровых добровольцев. При этом наиболее значимыми данные изменения были у пациентов с лекарственно-чувствительным вариантом инфильтративного ТЛ. Исключение составили пациенты с диссеминированной формой ЛУТЛ, у которых значения BCG-индуцированной секреции IL-27 оставались в пределах нормы (табл. 1).

Уровень базальной и стимулированной секреции IL-12p70 мононуклеарными лейкоцитами крови у больных ТЛ, напротив, оказался ниже нормы (табл. 1). При этом минимальные значения спонтанной его секреции регистрировались в группе больных с инфильтративным ЛУТЛ, а BCG-индуцированной – у пациентов с диссеминированной формой ЛЧТЛ. Исключением была группа пациентов с диссеминированной формой ЛУТЛ, где значимых изменений со сто-

роны спонтанной и индуцированной секреции IL-12p70 выявлено не было (табл. 1).

Вместе с тем у больных с различными вариантами ТЛ регистрировалось увеличение секреции IL-12p40, наиболее выраженное при инфильтративном и диссеминированном ЛУТЛ. Данный показатель превышал значения исследуемого параметра как у здоровых добровольцев (в 5,3 и 4,1 раза соответственно), так и у пациентов с аналогичными формами ЛЧТЛ (в 2,3 и 1,4 раза соответственно) (табл. 2).

Продукция IL-12p35 *in vitro* в условиях BCG-индукции у больных с диссеминированным ЛУТЛ оставалась в пределах нормы, но снижалась (относительно контрольных величин) у пациентов в других обследуемых группах. При этом инфильтративный и диссеминированный ЛЧТЛ характеризовались более низким уровнем BCG-индуцированной секреции IL-12p35, чем у здоровых добровольцев (в среднем в 2,5 раза) и по сравнению с параметрами в группах с аналогичными клиническими формами ЛУТЛ (в 1,7 и 2,1 раза соответственно) (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1. БАЗАЛЬНАЯ И BCG-ИНДУЦИРОВАННАЯ СЕКРЕЦИЯ IL-27 И IL-12p70 МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		IL-27, пг/мл		IL-12p70, пг/мл	
		Базальная секреция	BCG-индуцированная секреция	Базальная секреция	BCG-индуцированная секреция
Здоровые добровольцы		87,54 (77,51-97,40)	579,80 (503,30-742,01) $p_4 < 0,001$	50,50 (45,24-58,51)	128,21 (117,32-165,00) $p_4 < 0,001$
Инфильтративный	ЛЧТЛ	188,01 (169,01-257,80) $p_1 < 0,001$	1067,30 (942,00-1300,50) $p_1 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	30,33 (25,99-39,55) $p_1 < 0,001$	60,76 (51,24-106,00) $p_1 < 0,001$ $p_4 < 0,001$
	ЛУТЛ	118,30 (110,20-136,10) $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,0001$	786,11 (630,60-1100,50) $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,001$	15,51 (12,75-20,31) $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,001$	77,00 (70,44-86,49) $p_1 < 0,01$ $p_4 < 0,001$
Диссеминированный	ЛЧТЛ	130,20 (109,60-147,90) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	1004,40 (908,10-1281,30) $p_1 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	24,47 (19,05-36,49) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	57,02 (43,17-74,03) $p_1 < 0,01$ $p_4 < 0,01$
	ЛУТЛ	141,50 (129,60-161,80) $p_1 < 0,001$	489,70 (417,60-732,90) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	48,40 (40,57-68,62) $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	105,50 (97,22-268,50) $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,001$

Примечание. Здесь и в таблицах 2, 3: ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких; ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких; p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p_2 – у больных с инфильтративным туберкулезом легких; p_3 – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p_4 – с показателями базальной секреции (без использования индукторов).

ТАБЛИЦА 2. ВСГ-ИНДУЦИРОВАННАЯ СЕКРЕЦИЯ IL-12p40 И IL-12p35 МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, Ме (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		IL-12p40, пг/мл	IL-12p35, пг/мл
Здоровые добровольцы		264,81 (247,41-294,90)	79,31 (72,71-91,49)
Инфильтративный	ЛЧТЛ	610,10 (530,20-687,10) $p_1 < 0,001$	32,16 (26,25-53,76) $p_1 < 0,001$
	ЛУТЛ	1411,80 (1196,90-1591,50) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,001$	56,61 (45,90-63,46) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,01$
Диссеминированный	ЛЧТЛ	768,20 (733,00-958,50) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,001$	31,94 (24,09-37,01) $p_1 < 0,001$
	ЛУТЛ	1079,10 (955,80-1238,10) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,01; p_3 < 0,001$	68,14 (54,64-99,29) $p_3 < 0,01$

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ IL-12R β 2, WSX-1 И gp130 В УСЛОВИЯХ IL-12/IL-27-ИНДУКЦИИ *IN VITRO*, У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, Ме (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		CD3 ⁺ IL-12R β 2 ⁺ , %	CD3 ⁺ WSX1 ⁺ , %	CD3 ⁺ WSX1 ^{hi} , %	CD3 ⁺ gp130 ⁺ , %
Здоровые добровольцы		35,76 (32,37-39,15)	34,04 (29,79-40,31)	3,93 (3,30-5,43)	53,14 (49,37-55,41)
Инфильтративный	ЛЧТЛ	20,18 (16,06-22,12) $p_1 < 0,001$	46,46 (41,47-50,28) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,001$	7,78 (5,27-8,29) $p_1 < 0,001$	35,33 (31,27-37,04) $p_1 < 0,001$
	ЛУТЛ	16,64 (13,06-21,00) $p_1 < 0,001$	51,13 (44,99-56,49) $p_1 < 0,001$	9,55 (7,34-12,01) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,01$	36,62 (32,06-44,29) $p_1 < 0,001$
Диссеминированный	ЛЧТЛ	20,15 (18,96-21,79) $p_1 < 0,001$	32,74 (26,99-36,87) $p_2 < 0,001$	7,18 (6,03-9,78) $p_1 < 0,001$	35,28 (29,96-37,92) $p_1 < 0,001$
	ЛУТЛ	16,67 (13,46-18,87) $p_1 < 0,001; p_3 < 0,01$	27,48 (24,85-31,98) $p_2 < 0,001$	7,98 (6,09-8,62) $p_1 < 0,001$	29,21 (26,80-32,33) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,001; p_3 < 0,05$

Наряду с цитокиновым дисбалансом, у больных ТЛ регистрировались однонаправленные изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов, проявляющиеся в снижении относительного числа CD3⁺IL12R β 2⁺ и CD3⁺gp130⁺ клеток на фоне увеличения численности CD3⁺WSX1^{hi} лимфоцитов (табл. 3). Изменения со стороны количества CD3⁺WSX1⁺ лимфоцитов у больных ТЛ регистрировались только при инфильтративном ЛЧТЛ и ЛУТЛ и проявлялись его увеличением по сравнению с показателями в группе контроля. У пациентов с диссеминированной формой ТЛ содержание CD3⁺WSX1⁺ лимфоцитов оставалось в пределах нормы (табл. 3).

Обсуждение

Как было отмечено выше, IL-27 является цитокином, обеспечивающим активацию Th1-лимфоцитов на начальных этапах иммунного ответа за счет индукции экспрессии β 2-субъединицы рецептора к IL-12 [4, 27]. К эффектам IL-27, кроме стимуляции экспрессии IL-12R β 2, относят его способность подавлять экспрессию транскрипционного фактора STAT6 за счет блокады Th2-направляющего фактора транскрипции GATA-3; существенно (в синергизме с IL-12p70) повышать продукцию IFN γ Th1-лимфоцитами [14]. Однако среди эффектов данного цитокина отмечают и его способность проявлять противовоспалительные свойства. Показано, что IL-27 способен тормо-

зять продукцию IL-2 активированными Th1-клетками на поздних стадиях воспалительного процесса, контролируя баланс между активацией клеточного иммунного ответа и объемом разрушения собственных тканей организма; активировать IL-10-секреторную активность регуляторных Т-лимфоцитов (Treg); влиять на макрофагальные клетки, изменяя их бактерицидную активность [13, 16, 18, 22, 23, 24, 26]. Так, показано, что нейтрализация эффектов IL-27 в присутствии IL-12p70 уменьшала численность жизнеспособных *M. tuberculosis*, извлеченных из макрофагов, а сам IL-27, полученный из макрофагов во время инфекции, напротив, препятствовал контролю за ростом микобактериальной популяции [18]. Можно полагать, что высокий уровень секреции IL-27 на фоне гипопродукции IL-12p70, установленный в настоящем исследовании при ТЛ, является следствием влияния *M. tuberculosis* на APC, направленного на выживание патогена внутри фагоцитирующей клетки. Кроме того, к биологическим эффектам возбудителя туберкулеза в отношении APC и их функциональных свойств, на наш взгляд, можно отнести и гиперсекрецию IL-12p40, выявленную в настоящей работе. Наряду с гипосекрецией гетеродимера IL-12p70, повышенная секреция IL-12p40 может стать очередным препятствием на пути формирования Th1-иммунного ответа против *M. tuberculosis*. Полагают, что высокие концентрации IL-12p40 способны формировать неактивные гомодимеры, связывание которых с рецептором IL-12R (IL-12R β 1/IL-12R β 2) приводит к блокаде последнего и препятствует передаче сигнала активации внутрь клетки [4].

Таким образом, установленный у больных ТЛ дефицит секреции IL-12p70 и IL-12p35 в условиях гиперпродукции IL-27 и IL-12p40 позволяет предположить «сбой» в механизмах инициации Т-клеточного ответа, связанный с индуцированным *M. tuberculosis* нарушением цитокинсекреторной активности APC.

Что касается диссеминированного ЛУТЛ, при котором BCG-индуцированная продукция цитокинов (IL-27, IL-12p70, IL-12p35) оставалась в пределах нормы, то вероятным представляется то, что нарушения иммунного ответа при данной форме ЛУТЛ в большей степени связаны с «дефектами» непосредственно Т-клеточного звена иммунитета. Так, показано, что при диссеминированном ЛУТЛ имеет место более выраженный дефицит Т-лимфоцитов и секреции ими IL-2, увеличение числа апоптотических форм Т-клеток; более ярко представлены структурные изменения плазматической мембраны лимфоцитов крови, проявляющиеся утратой вор-

синчатости, пузыревидными вздутиями на фоне снижения микровязкости анулярной липидной фазы и нарушением белок-липидных контактов [5, 6, 8, 10]. Выраженность описанных изменений в лимфоцитах предположительно связывают с биологическими свойствами возбудителя, обладающего устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, и рассматривают как один из способов стратегии выживания, применяемой *M. tuberculosis*, определяющей в конечном итоге гибель Т-клеток-эффекторов, способствующих уничтожению патогена [6, 8, 10].

Данное предположение отчасти подтверждают результаты настоящего исследования, которые позволили установить у больных ТЛ нарушения экспрессии на Т-лимфоцитах рецепторных молекул к Th1-ассоциированным цитокинам. Так, при специфической IL-12/IL-27-индукции лимфоцитов *in vitro* у больных ТЛ отмечался выраженный дисбаланс (относительно контрольных значений) в численности Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы gp130 и WSX-1. Это проявлялось в уменьшении числа CD3⁺gp130⁺ лимфоцитов на фоне повышенного содержания Т-клеток с высокой экспрессией молекулы WSX-1 (CD3⁺WSX-1^{hi}). При этом снижение количества CD3-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецепторную молекулу gp130, было максимальным при диссеминированном ЛУТЛ (табл. 3). Вместе с тем у больных ТЛ (независимо от клинической формы заболевания) регистрировалось снижение количества клеток, экспрессирующих β 2-субъединицу рецептора к IL-12 – IL-12R β 2 (в 1,8 раза при ЛЧТЛ и в 2,1 раза при ЛУТЛ по сравнению с показателями в группе здоровых добровольцев) (табл. 3).

Известно, что рецепторная молекула WSX-1 конституционно экспрессируется в основном наивными CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, а также NK-клетками. Молекула gp130, в свою очередь, представлена на большом числе клеточных субпопуляций, а уровень ее экспрессии варьирует в зависимости от степени активации клеток [4, 15, 20]. При этом молекуле WSX-1 отводят роль ингибитора пролиферации Т-клеток в норме и только в комплексе с gp130 она проявляет Th1-активирующее влияние за счет взаимодействия с IL-27 [4, 21]. Показано, что дефицит WSX-1-несущих клеток приводит к снижению функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), но при этом он не влияет на численность Th1-субпопуляции лимфоцитов. Высокая экспрессия WSX-1 на поверхности Т-клеток, наоборот, способствует секреции иммуносупрессорного цитокина IL-10, что связывают с активацией Treg

под влиянием IL-27 [16, 23, 26]. В свою очередь, избыток IL-10 в комплексе с IL-27 может ингибировать Th1-лимфоциты (в том числе и экспрессию на них рецепторной молекулы gp130) и активировать Т-хелперы типа 2 с переориентацией иммунного ответа с клеточно-опосредованного типа на гуморальный [16, 23]. Снижение числа CD3⁺gp130⁺ лимфоцитов в условиях избытка WSX-1-несущих Т-клеток, в свою очередь, способствует нарушению процессов передачи активационного сигнала от IL-27 в Т-лимфоцитах. Учитывая, что основным эффектом IL-27, связанным с активацией Th1-лимфоцитов, является индукция экспрессии β 2-субъединицы рецептора к IL-12p70, нарушение сигналинга от WSX-1/gp130-рецептора в Т-клетках приводит к снижению численности CD3⁺IL12R β 2⁺ лимфоцитов.

Таким образом, выявленное в настоящем исследовании у больных ТЛ снижение числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих gp130-

субъединицу рецептора к IL-27, на фоне гиперпродукции самого цитокина и высокой экспрессии на Т-клетках ингибиторной молекулы WSX-1, может быть (учитывая данные литературы) причиной активации Treg, характерной для ТЛ [8, 9]. Активация Treg способствует еще большему снижению экспрессии рецепторной молекулы gp130 на Th0-лимфоцитах, что приводит к нарушению формирования полноценного активного гетеродимерного рецептора к IL-27 и угнетению активирующего влияния последнего на Th0-клетки. Это сопровождается уменьшением экспрессии IL-12R β 2 на Th0-лимфоцитах, которое в сочетании с высокой секрецией супрессорного гомодимера IL-12p40 и гипопродукцией IL-12p70 APC у больных ТЛ, очевидно, нивелирует активационные эффекты IL-12p70, что, в свою очередь, приводит к нарушению IL-12-опосредованной активации Th1-лимфоцитов в целом.

Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. — 264 с.
 2. Ивашкин, В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // РЖГГК. — 2008. — № 4. — С. 4-13.
 3. Кетлинский С.А. Роль гетеродимерных цитокинов семейства IL-12 в развитии и регуляции врожденного иммунитета и Th1 иммунного ответа // Медицинский академический журнал. — 2005. — Т. 5, № 3. — С. 13-25.
 4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.
 5. Корецкая Н.М. Остропрогрессирующий туберкулез легких: клиника, диагностика, лечение // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2011. — № 7. — С. 33-34.
 6. Кошкина А.А. Механизмы дизрегуляции рецепторопосредованной сигнальной трансдукции в Т-лимфоцитах крови при туберкулезе легких // Фундаментальные исследования. — 2012. — Ч. 1, № 8. — С. 91-95.
 7. Симбирцев А.С. Роль цитокинов в регуляции физиологических функций иммунной системы // Физиология и патология иммунной системы. — 2004. — № 10. — С. 3-10.
 8. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И. Факторы иммуносупрессии при различных патологиях // Бюллетень сибирской медицины. — 2012. — № 4. — С. 103-111.
 9. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. Регуляторные Т-клетки. Иммуносупрессорные эффекты при туберкулезе легких. — Saarbrücken: LAPLAMBERT Academic Publishing Gmb H&Co. KG, 2012. — 169 с.
 10. Шилько Т.А. Патогенетические факторы модуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Томск., 2009. — 44 с.
 11. Ярилин А. А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
- Ссылки 12-27 см. в References (стр. 245-246). See References for numbers 12-27 at pp. 245-246.

References

1. Gol'dberg E.D., Dygay A.M., Shakhov V.P. Metody kul'tury tkani v gematologii [Tissue culture methods in hematology]. Tomsk, Tomsk University Publishing House, 1992. 264 p.
2. Ivashkin V.T. Osnovnye ponyatiya i polozheniya fundamental'noy immunologii [The basic concepts and provisions of basic immunology]. RZHGGK — Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology, 2008, no. 4, pp. 4-13.

3. Ketlinskiy S.A. Rol' geterodimernykh tsitokinov semeystva IL-12 v razvitii i regulyatsii vrozhdennogo immuniteta i TH1 immunnogo otveta [The role of heterodimeric cytokines of the IL-12 family in the development and regulation of the inborn immunity and TH1 immune response]. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal – Medical Academic Journal*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 13-25.
4. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Tsitokiny [Cytokines]. *St. Petersburg, Publishing house the Foliant*, 2008. 552 p.
5. Koretskaya N.M. Ostroprogressivnyy tuberkulez legkikh: klinika, diagnostika, lechenie [Acute progressive pulmonary tuberculosis: clinical features, diagnosis, treatment]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy – International Journal of Applied and Basic Research*, 2011, no. 7, pp. 33-34.
6. Koshkina A.A. Mekhanizmy dizregulyatsii retseptoroposredovannoy signal'noy transduksii v T-limfotsitakh krovi pri tuberkuloze liogkikh [Mechanisms of dysregulation of receptor-signal transduction in T-lymphocytes in pulmonary tuberculosis]. *Fundamental'nye issledovaniya – Basic Research*, 2012, part 1, no. 8, pp. 91-95.
7. Simbirtsev A.S. Rol' tsitokinov v regulyatsii fiziologicheskikh funktsiy immunnoy sistemy [The role of cytokines in the regulation of physiological functions of the immune system]. *Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy – Physiology and Pathology of the Immune System*, 2004, no. 10, pp. 3-10.
8. Churina E.G., Novitskiy V.V., Urazova O.I. Faktory immunosupressii pri razlichnykh patologiyakh [Factors of immunosuppression in various pathologies]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of the Siberian Medicine*, 2012, no. 4, pp. 103-111.
9. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. Regulyatornye T-kletki. Immunosupressornye efekty pri tuberkuleze legkikh [Regulatory T cells. Immunosuppressive effects of pulmonary tuberculosis]. *Saarbrücken: LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH & Co, KG*, 2012. 169 p.
10. Shil'ko T.A. Patogeneticheskie faktory modulyatsii apoptoza mononuklearnnykh leykotsitov krovi pri tuberkuleze legkikh: Avtoref. Dis. d-ra med. nauk [Pathogenetic factors modulating apoptosis of blood mononuclear leukocytes blood in pulmonary tuberculosis. Autoref. Doct. med. sci. diss.]. *Tomsk*, 2009. 44 p.
11. Yarilin A.A. Immunologiya [Immunology]. *Moscow, GEOTAR-Media*, 2010. 752 p.
12. Agnello D., Lankford C.S., Bream J., Morinobu A., Gadina M., O'Shea J.J., Frucht D.M. Cytokines and Transcription Factors That Regulate T Helper Cell Differentiation: New Players and New Insights. *Journal of Clinical Immunology*, 2003, vol. 23, no. 3, pp. 147-161.
13. Cooper A.M., Solache A., Khader S.A. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Current Opinion in Immunology*, 2007, vol. 19, no. 4, pp. 441-447.
14. Huber M., Steinwald V., Guralnik A., Brüstle A., Kleemann P., Rosenplänter C., Decker T., Lohoff M. IL-27 inhibits the development of regulatory T cells via STAT3. *Int. Immunology*, 2008, vol. 20, no. 2, pp. 223-234.
15. Hunter C.A., Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity*, 2012, vol. 37, no. 6, pp. 960-969.
16. McAleer P.J., Saris C.J., Vella A.T. The WSX-1 pathway restrains intestinal T-cell immunity. *Int. Immunol*, 2011, vol. 23, no. 2, pp. 129-137.
17. Pompei L., Jang S., Zamlynny B., Ravikumar S., McBride A., Hickman S.P., Salgame P. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. *J. Immunol*, 2007, vol. 178, no. 8, pp. 5192-5199.
18. Robinson C.M., Nau G.J. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect Dis.*, 2008, vol. 198, no. 3, pp. 359-366.
19. Schwander S., Dheda K. Human lung immunity against Mycobacterium tuberculosis: insights into pathogenesis and protection. *Am. J. Respir Crit Care Med*, 2011, vol. 183, no. 6, pp. 696-707.
20. Silver J.S., Hunter C.A. Gp130 at the Nexus of Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Journal of leukocyte biology*, 2010, vol. 88, no. 6, pp. 1145-1156.
21. Takeda A., Hamano S., Shiraishi H., Yoshimura T., Ogata H., Ishii K., Ishibashi T., Yoshimura A., Yoshida H. WSX-1 over-expression in CD4(+) T cells leads to hyperproliferation and cytokine hyperproduction in response to TCR stimulation. *Int. Immunol*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 889-897.
22. Villarino A.V., Stumhofer J.S., Saris C.J., Kastelein R.A., de Sauvage F.J., Hunter C.A. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J. Immunol*, 2006, vol. 176, no. 1, pp. 237-247.

23. Villarino A.V., Artis D., Bezbradica J.S., Miller O., Saris C.J., Joyce S., Hunter C.A. IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD. *Int. Immunol*, 2008, vol. 20, no. 6, pp. 739-752.

24. Villarino A.V., Larkin J. 3rd, Saris C.J., Caton A.J., Lucas S., Wong T., de Sauvage F.J., Hunter C.A. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J. Immunol*, 2005, vol. 174, no. 12, pp. 7684-7691.

25. Watford W.T., Hissong B.D., Bream J.H., Kanno Y., Muul L., O'Shea J.J. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunological Reviews*, 2004, no. 202, pp. 139-156.

26. Yoshida H., Nakaya M., Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *J. Leukoc Biol*, 2009, vol. 86, no. 6, pp. 1295-1303.

27. Zhao J., Perlman S. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN γ , IL-2 and IL-2R. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9, Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029447>.