ЭКСПРЕССИЯ мРНК ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ RORC2 И FoxP3 В ЛИМФОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

© *Т. Е. Кононова*,[1, *] *О. И. Уразова*,[1] *В. В. Новицкий*,[1, 2] *Е. Г. Чурина*,[1] *П. А. Захарова*[1]

[1] *Кафедра патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ, Томск, и* [2] *Лаборатория моделирования физических процессов в биологии и медицине Национального исследовательского Томского государственного университета*;
* *электронный адрес*: *kononova.te@gmail.com*

Гомеостаз субпопуляций Th17- и Treg-лимфоцитов играет важную роль в целостном и скоординированном процессе эрадикации возбудителей и предотвращении распространения инфекции в организме. Особенно актуальными являются исследования молекулярных механизмов, контролирующих баланс этих клеток при формировании иммунной девиации в патогенезе инфекционного процесса. Представлены результаты исследования уровня экспрессии мРНК транскрипционных факторов Th17- и Treg-лимфоцитов — RORC2 и FoxP3 соответственно, а также содержания этих клеток в периферической крови при инфекционной патологии (на примере инфекции, вызванной *Mycobacterium tuberculosis*). Установлено, что течение инфильтративного (вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя) и диссеминированного лекарственно-чувствительного туберкулеза легких (ТЛ) сопровождается Th17-поляризацией дифференцировки Т-лимфоцитов, о чем свидетельствует увеличение количества $CD4^+CD161^+IL17A^+$-клеток в крови во взаимосвязи с повышенной экспрессией мРНК транскрипционного фактора RORC2 в лимфоцитах. При диссеминированном лекарственно-устойчивом ТЛ дифференцировка Т-лимфоцитов осуществляется преимущественного в направлении иммуносупрессорных Treg-клеток, о чем свидетельствует увеличение их количества в крови в сочетании с повышенным уровнем экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах.

Ключевые слова: транскрипционные факторы, RORC2, FoxP3, Th17-лимфоциты, Treg-лимфоциты, туберкулез легких.

Принятые сокращения: ЛУ — лекарственно-устойчивый, ЛЧ — лекарственно-чувствительный, ТЛ — туберкулез легких, ТФ — транскрипционный фактор, FoxP3 (Forkhead Box P3) — белок скурфин, ТФ Treg, IL (Interleukine) — интерлейкин, ROR (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor) — «рецепторы-сироты», родственные ретиноидным, ТФ Th17, TGFβ — трансформирующий фактор роста β, Th — Т-лимфоциты-хелперы, Treg (regulatory T-cells) — регуляторные Т-лимфоциты.

Известно, что развитие и прогрессирующее течение инфекционных, аутоиммунных и опухолевых заболеваний зависят от баланса в организме различных субпопуляций Т-лимфоцитов-хелперов (Th). В основе дифференцировки этих клеток лежат процессы, связанные с регуляцией экспрессии генов. Главная роль в этом принадлежит ТФ, которые являются конечными белковыми продуктами процессов сигнальной трансдукции — последовательных внутриклеточных сигнальных каскадов. ТФ взаимодействуют с регуляторными участками генов, вызывая их экспрессию, что в дальнейшем сопровождается дифференцировкой клеток (Ярилин, 2010; Burgler et al., 2010). При этом дифференцировка и пролиферация Th17-лимфоцитов, осуществляющих защитную функцию в процессе реализации противоинфекционного иммунитета, определяются ТФ RORC2 и происходят в тесной взаимосвязи с другой субпопуляцией Т-клеток — регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), за дифференцировку которых ответствен ТФ FoxP3 (Forkhead Box P3) (Caramori et al., 2011; Кононова и др., 2013; Chen, Oppenheim, 2014). Избыточная активность Treg-лимфоцитов, напротив, приводит к ослаблению иммунных реакций, что сопровождается развитием воспалительных и инфекционных заболеваний (Lee et al., 2010). С учетом рассматриваемой в последнее время концепции ведущей роли иммуносупрессии в прогрессирующем течении инфекционных заболеваний особую актуальность приобретает изучение механизмов, регулирующих баланс Th17- и Treg-лимфоцитов при инфекционной патологии.

Цель настоящего исследования — оценка экспрессии мРНК ТФ RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах и анализ ее взаимосвязи с соотношением Th17- и Treg-клеток в крови при инфекционной патологии.

Материал и методика

Настоящее исследование проводили в группах больных (87 пациентов в возрасте от 20 до 55 лет, средний возраст 41.21 ± 11.29 года) с различными клинико-пато-

Таблица 1

Последовательность нуклеотидов в праймерах, используемых для оценки экспрессии генов транскрипционных факторов RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах

Ген	Последовательность нуклеотидов прямого (F) и обратного (R) праймеров
rorc2	F: 5′ TTCCAGGTCTCAGTGTAAGTCC 3′ R: 5′ AGTGCTTTGTCTTAGTGCTGTG 3′
foxp3	F: 5′ GCACATTCCCAGAGTTCCTC 3′ R: 5′ CAGTGGTAGATCTCATTGAGTGTC 3′
β-actin	F: 5′ CATTTCCGAAGCGAGTGTCT 3′ R: 5′ GAGCGATTCCGGACTACCTT 3′

генетическими формами инфекционной патологии (на примере инфекции, вызванной *Mycobacterium tuberculosis*). Пациенты находились на стационарном лечении в ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр». Диагноз ТЛ устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования органов грудной клетки и результатов микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Контрольную группу составили 35 здоровых добровольцев с аналогичным группе исследования распределением по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля. Материалом для исследования служила периферическая кровь (10 мл), взятая утром натощак из локтевой вены больных ТЛ и здоровых доноров. Исследование у больных проводили однократно до начала специфической противотуберкулезной терапии.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) выдерживали при 37 °С в течение 30 мин для отделения плазмы от эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности фиколла (ρ = 1077 кг/м^3) (Биолот, Россия) в соотношении 1 : 2 и центрифугировали при 300 *g* в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из мононуклеарных клеток осторожно через верхний слой плазмы собирали пипеткой, дважды отмывали средой RPMI-1640 (ЗАО Вектор, Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 300 *g*.

Определение экспрессии мРНК ТФ. Выделение тотальной РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом согласно инструкции фирмы-производителя (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции, используя набор реагентов для проведения обратной транскрипции (Синтол, Россия). Полученный фрагмент кДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) на амплификаторе DTprime (ДТ-96) (ДНК-технология, Россия). ПЦР-РВ проводили при следующих условиях: денатурация при 94 °С в течение 3 мин, далее 45 циклов амплификации в следующем температурно-временно́м режиме — плавление при 94 °С в течение 6 с, отжиг при 60 °С в течение 6 с и элонгация при 72 °С в течение 6 с. Затем строили кривые плавления с шагом 0.5 °С. В качестве референсного гена использовали ген β-актина, который является одним из наиболее стабильно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства для исследуемых клеток. Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК, представлены в табл. 1. Определение относительного количества кДНК в образце проводили с использованием сравнительного метода $\Delta\Delta C_t$ — вычисляли значение $2^{(C_t \text{ исследуемого гена} - C_t \text{ референсного гена})}$, где C_t (cycle threshold) — пороговый цикл реакции. Результаты выражали в относительных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена β-актина).

Иммунофенотипирование лимфоцитов. Для определения экспрессии поверхностных рецепторных молекул CD4, CD25 и CD161, внутриклеточного цитокина IL-17A и ТФ FoxP3 в лимфоцитах периферической крови применяли метод проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентными метками (PerCP, PE-Cy5, FITC и PE; Becton Dickinson, США).

Для определения количества $CD4^+CD161^+IL\text{-}17A^+$ (Th17) лимфоцитов клетки стимулировали коктейлем, содержащим 4-форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в комбинации с иономицином (Bioscience, США) с добавлением блокатора транспорта протеинов, содержавшего моненсин (Becton Dickinson, США). Клеточные суспензии инкубировали в течение 4 ч при 37 °С и 5 % CO_2. Процедуру окрашивания осуществляли согласно протоколам фирмы-производителя (Becton Dickinson, США). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur Flow cytometr BD (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Положение квадрантного маркера выставляли согласно окраске клеток изотипическими контролями к каждому моноклональному антителу. Полученные данные анализировали при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Статистический анализ результатов осуществляли с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения признака использовали критерий Шапиро—Уилка. Поскольку все количественные признаки в группах сравнения не имели нормального распределения, результаты представляли в виде медианы (Me), верхнего (75 %) и нижнего (25 %) квартилей (Me (Q_1-Q_3)). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$. Для оценки взаимосвязи между изучаемыми параметрами проводили корреляци-

Таблица 2

Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов RORC2 и FoxP3 в лимфоцитах

Группы обследованных лиц		Уровень экспрессии мРНК, отн. ед.	
		ген *rorc2*	ген *foxp3*
Здоровые доноры		1.47 (0.96—1.96)	17.15 (8.57—22.63)
Больные инфильтративным ТЛ	ЛЧ ТЛ	3.60 (3.48—3.73) $P_1 = 0.001$	15.25 (12.13—18.38)
	ЛУ ТЛ	9.85 (6.06—22.63) $P_1 = 0.0005$	15.07 (13.00—17.15)
Больные диссеминированным ТЛ	ЛЧ ТЛ	3.25 (2.46—4.00) $P_1 = 0.0005$	15.67 (13.69—17.20)
	ЛУ ТЛ	1.07 (0.09—1.15)	27.72 (22.63—30.89) $P_1 = 0.004$

Примечание. Здесь и в табл. 3 P_1 — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров, данные представлены в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей, Me (Q_1—Q_3).

онный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Корреляцию считали значимой при $P < 0.05$.

Результаты

В ходе проведенного исследования установлено достоверное увеличение экспрессии мРНК RORC2 (ТФ Th17) в лимфоцитах у пациентов с инфильтративным (лекарственно-чувствительным (ЛЧ) и лекарственно-устойчивым (ЛУ)) и диссеминированным ЛЧ ТЛ в 2.4 ($P_1 = 0.001$), 6.7 ($P_1 = 0.0005$) и 2.2 ($P_1 = 0.0005$) раза соответственно по сравнению с группой здоровых доноров. Исключение составили больные с диссеминированным ЛУ ТЛ, у которых уровень экспрессии мРНК RORC 2 не отличался от такового в группе контроля (табл. 2). Необходимо отметить, что у пациентов с инфильтративным ТЛ в случае лекарственной устойчивости возбудителя регистрировали наиболее выраженное увеличение исследуемого показателя — уровень экспрессии мРНК RORC2 составил 9.85 отн. ед. при норме 1.47 (табл. 2).

При исследовании экспрессии мРНК FoxP3 (ТФ Treg) установлено достоверное ее увеличение в лимфоцитах только у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ (в 1.6 раза ($P_1 = 0.004$)) (табл. 2). Уровень экспрессии мРНК FoxP3 в этой группе больных составил 27.72 отн. ед. при норме 17.15. В остальных группах больных статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено (табл. 2).

При оценке содержания $CD4^+CD161^+IL\text{-}17A^+$ Th17-лимфоцитов в периферической крови у пациентов выявлено достоверное его повышение (в среднем в 2.4 раза, $P_1 < 0.05$), за исключением больных с диссеминированным ЛУ ТЛ (табл. 3), у которых количество Th17-лимфоцитов не отличалось от нормы, но было достоверно ниже, чем у больных инфильтративным ЛУ ТЛ в 2.8 раза ($P_2 < 0.05$) (табл. 3).

Необходимо отметить, что у пациентов с инфильтративным ЛУ ТЛ содержание Th17-лимфоцитов в крови было выше, чем в группе больных с инфильтративным ЛЧ ТЛ в среднем в 2.1 раза ($P_3 < 0.05$), тогда как у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ, напротив, оно оказалось достоверно ниже по сравнению с таковым в группе больных с диссеминированным ЛЧ ТЛ в 2 раза ($P_3 < 0.05$) (табл. 3).

При оценке количества $CD4^+CD25^+FoxP3^+$Treg-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ было отмечено статистически достоверное его повышение лишь в группе больных с диссеминированным ЛУ ТЛ — в 2.3 раза ($P_1 = 0.038$) (табл. 3). Значимых различий исследуемого показателя у пациентов в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя не выявлено.

Обсуждение

В процессе реализации противоинфекционной защиты организма большое внимание исследователей уделяется различным субпопуляциям $CD4^+$ Th-лимфоцитов. В частности, особый интерес представляют Th17- и Treg-лимфоциты, которые являются активными участниками антиген-специфического иммунного ответа, реализующегося как на уровне системных иммунологических реакций, так и на уровне локального иммунитета. При этом гомеостаз в структуре этих субпопуляций играет важную роль в целостном и скоординированном процессе эрадикации возбудителей и предотвращении распространения инфекции. Вместе с тем их вклад в развитие и прогрессирующее течение инфекционных заболеваний только начинает изучаться. Остается открытым вопрос о том, нарушение каких механизмов иммунного ответа на возбудитель способствует развитию иммунорегуляторного дисбаланса и прогрессирующему течению инфекционного процесса.

В качестве модели инфекционного процесса выбрали ТЛ, являющийся классическим примером бактериальной инфекции с внутриклеточной локализацией возбудителя.

В ходе проведенного исследования установлено повышение абсолютного и относительного содержания Th17-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с инфильтративным ТЛ (независимо от лекарственной чувствительности возбудителя) и диссеминированным ЛЧ ТЛ по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 3).

Известно, что Th17-лимфоциты принимают участие в защите организма от различных бактерий, способствуя развитию противоинфекционного (в том числе антимико-

Таблица 3

Количество Th17- и Treg-лимфоцитов в периферической крови больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц		$CD4^+CD161^+IL17A^+$ Th17-лимфоциты	$CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg-лимфоциты
Здоровые доноры		1.37 (0.80—2.60) **0.023 (0.016—0.044)**	2.64 (2.00—3.34) **0.051 (0.032—0.080)**
Больные инфильтративным ТЛ	ЛЧ ТЛ	2.79 (1.80—4.34) P_1 = 0.014 **0.052 (0.032—0.087)** **P_1 = 0.026**	4.0 (2.0—4.0) **0.06 (0.03—0.07)**
	ЛУ ТЛ	5.60 (4.30—10.00) P_1 = 0.000031; P_3 = 0.003 **0.123 (0.077—0.410)** **P_1 = 0.000018; P_3 = 0.005**	2.9 (1.0—5.0) **0.04 (0.01—0.08)**
Больные диссеминированным ТЛ	ЛЧ ТЛ	3.10 (2.80—5.10) P_1 = 0.008 **0.058 (0.041—0.093)** **P_1 = 0.015**	1.5 (0.85—3.63) **0.030 (0.015—0.072)**
	ЛУ ТЛ	1.50 (0.75—2.40) P_2 = 0.002; P_3 = 0.046 **0.030 (0.013—0.043)** **P_2 = 0.000089; P_3 = 0.046**	6.0 (3.0—8.0) P_1 = 0.038 **0.120 (0.042—0.159)**

Примечание. Величины указаны в % и в абсолютных числах, $\times 10^9$/л (отмечены жирным шрифтом). P_2 — по сравнению с показателями у больных с инфильтративным туберкулезом легких, P_3 — по сравнению с показателями у больных с ЛЧТЛ.

бактериального) иммунитета дыхательных путей. Продуцируя широкий спектр провоспалительных цитокинов — IL-17, IL-22, IL-26, фактор некроза опухоли (TNF) α, Th17-лимфоциты способствуют привлечению иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления и контролю инфекционного процесса (Khader, Gopal, 2010; Li et al., 2011).

Тот факт, что Th17-лимфоциты являются уникальной (в отношении реализуемых ими функций) субпопуляцией клеток, побудило ученых к изучению их происхождения и функций. Установлено, что Th17-лимфоциты дифференцируются из «наивных» $CD4^+$ Th0-лимфоцитов в ответ на стимуляцию IL-1β, IL-6 и TGFβ (в малых количествах). Связываясь со своими рецепторами, эти цитокины индуцируют каскад внутриклеточных реакций, сопровождающийся повышением экспрессии ключевого регулятора дифференцировки Th17-лимфоцитов — ТФ RORC2, который в свою очередь усиливает экспрессию генов основных цитокинов этих клеток — IL-17A, IL-17F и IL-22 (Yang et al., 2011; Miossec, Kolls, 2012; McAleer, Kolls, 2014).

Наряду с этим обнаружено, что в условиях дефицита IL-6 Т-клетки не экспрессируют ROR, IL-23R и не синтезируют IL-17. Однако в этом случае дифференцировку Th0-лимфоцитов в направлении Th17 может индуцировать IL-21. Действуя совместно с TGFβ, этот цитокин способствует инициации Th17-ответа у человека. Необходимо отметить, что IL-6 и IL-21 реализуют свой эффект в отношении Th17-лимфоцитов через индукцию активатора дифференцировки — ТФ STAT3 (Egwuagu, 2009), тогда как действие TGFβ и IL-1β связано с активацией ТФ Smad3 и IRF4 соответственно (Liu et al., 2013).

Несомненно, важную роль в развитии Th17-лимфоцитов играет IL-23. Ранее полагали, что это ключевой цитокин Th17-ответа и что именно он инициирует образование Th17 (по крайней мере у мышей). Однако позднее было показано, что, скорее всего, IL-23 поддерживает функциональную активность уже дифференцированных Th17, поскольку рецепторы к нему (IL-23R) экспрессируются только на активированных клетках (Ярилин, 2010; Zheng, 2013).

При исследовании экспрессии мРНК RORC2 (ТФ Th17) в лимфоцитах нами было зарегистрировано ее увеличение у пациентов с инфильтративным (независимо от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам) ТЛ и диссеминированным ЛЧ ТЛ, т. е. в тех же группах исследования, в которых устанавливалось повышение содержания Th17-клеток в крови (табл. 2).

Повышение экспрессии мРНК транскрипционного фактора RORC2 и вследствие этого количества Th17-лимфоцитов в крови (что подтверждается положительной их взаимосвязью (r = 0.753, P = 0.045)) у пациентов с инфильтративным ТЛ и диссеминированным ЛЧ ТЛ, вероятно, свидетельствует о вовлечении Th17-лимфоцитов в реализацию противотуберкулезного иммунитета. Это является благоприятным фактором, поскольку опосредованное Th17-лимфоцитами привлечение в очаг воспаления макрофагов, нейтрофилов и Th1-лимфоцитов может способствовать отграничению очага повреждения в ткани легкого и препятствовать распространению инфекции.

Необходимо отметить, что Th17-лимфоциты, играя важную роль в развитии протективного иммунного ответа против внутри- и внеклеточных возбудителей, имеют общие пути дифференцировки с Treg-клетками, участвующими в реализации иммуносупрессии и иммунологической толерантности (Chen, Oppenheim, 2014). Тот факт, что Th17- и Treg-лимфоциты, имея общую клетку-предшественницу, выполняют совершенно противоположные функции, ориентирует исследователей на более подробное изучение молекулярных механизмов их развития (Zheng, 2013).

Предполагается, что баланс между дифференцировкой Th17- и Treg-лимфоцитов находится под сложным

контролем и осуществляется в результате скоординированной активности цитокинов и ТФ. Ряд исследований показал, что развитие Treg-лимфоцитов связано с процессом экспрессии гена *foxp3*. Экспрессия мРНК ТФ FoxP3 происходит за счет активации JAK/STAT-киназного пути. Происходящая под действием цитокинов (TGFβ и IL-2) индукция JAK-киназ сопровождается активацией и димеризацией молекул STAT5, которые, проникая в ядро, вызывают экспрессию гена *foxp3*. Конечным продуктом этой сигнальной трансдукции является образование белка скурфина — ТФ FoxP3. FoxP3, повышая экспрессию генов, отвечающих за продукцию цитокинов (IL-10 и TGFβ), направляет дифференцировку «наивных» Th0-лимфоцитов в направлении Treg (Coskun et al., 2013).

Необходимо отметить, что действие TGFβ зависит от его концентрации в среде. В низких дозах он индуцирует дифференцировку Th17-лимфоцитов, в то время как высокие концентрации цитокина стимулируют развитие Treg-лимфоцитов. Предполагается, что присутствие IL-6 является тем критическим фактором, благодаря которому TGFβ индуцирует дифференцировку Th17-лимфоцитов (Tesmer et al., 2008; Zheng, 2013).

Имеющиеся в настоящий момент сведения о влиянии IL-2 на развитие Treg-лимфоцитов и их функции неоднозначны. Предполагается, что в высоких дозах IL-2 стимулирует пролиферацию Treg-клеток и вместе с тем снижает интенсивность Т-клеточных реакций (Laurence et al., 2007; Zheng, 2013). Другими исследованиями, напротив, показано, что действие IL-2 на активированные Treg не сопровождается увеличением их пролиферации, однако способствует повышению выживаемости этих клеток (Eisenstein, Williams, 2009).

Анализ полученных в настоящем исследовании результатов показал достоверное увеличение экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах лишь у больных диссеминированным ТЛ в случае лекарственной устойчивости возбудителя по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (табл. 2), в то время как уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора RORC2 и количество Th17-лимфоцитов у них не отличались от контрольных их значений (табл. 2, 3).

Из данных литературы известно, что Treg-лимфоциты играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза, аутотолерантности, контроле над чрезмерной реакцией иммунных клеток на антигены. Вместе с тем опосредованное Treg-клетками угнетение антигензависимой дифференцировки и клональной экспансии Th-лимфоцитов, активация их апоптоза, а также подавление функции антигенпрезентирующих клеток лежат в основе нарушения антиген-специфического иммунного ответа, направленного на эрадикацию патогенов различной природы (Sakaguchi et al., 2010; Beyer, Schultze, 2011).

Таким образом, установленное в настоящем исследовании увеличение относительного количества Treg-лимфоцитов в периферической крови у больных с диссеминированным ЛУ ТЛ (табл. 3) в сочетании с повышением экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах **(**при положительной их взаимосвязи ($r = 0.602$, $P = 0.024$)**)** может свидетельствовать о более выраженных нарушениях в механизмах иммунной защиты у этой группы пациентов, поскольку реализация супрессорной активности Treg-лимфоцитов сопровождается угнетением иммунного ответа, длительной персистенцией возбудителя и прогрессирующим течением заболевания.

Подводя итог, необходимо отметить, что эффективная элиминация патогена из организма возможна лишь при условии формирования баланса между различными субпопуляциями Th-лимфоцитов. Смещение его в направлении дифференцировки Treg-клеток лежит в основе неблагоприятного течения или исхода инфекционного процесса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам президента РФ (№ НШ-184.2014.7).

Список литературы

Кононова Т. Е., *Уразова О. И.*, *Новицкий В. В.*, *Чурина Е. Г. 2013.* Опосредованная Т-лимфоцитами-хелперами типа 17 регуляция антибактериального (противотуберкулезного) иммунитета. Молекуляр. биол.. 47 (6) : 883—890. **(***Kononova T. E.*, *Urazova O. I.*, *Novitskii V. V.*, *Churina E. G. 2013.* Regulation of antibacterial (antitubercular) immunity mediated by T-helper type-17 lymphocytes. Mol. Biol. 47 (6) : 769—775.**)**

Ярилин А. А. 2010. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов. Иммунология. 31 (3) : 152—166. **(***Jarilin A. A. 2010*. Transkriptsionny regulators of a differentiation of T-helpers. Immunology. 31 (3) : 152—166.**)**

Beyer M., *Schultze J. L. 2011*. Plasticity of T(reg) cells: is reprogramming of T(reg) cells possible in the presence of FOXP3? Int. Immunopharmacol. 11 (5) : 555—560.

Burgler S., *Mantel P. Y.*, *Bassin C.*, *Ouaked N.*, *Akdis C. A.*, *Schmidt-Weber C. B. 2010.* RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FoxP3 promoter. J. Immunol. 184 : 6161—6169.

Caramori G., *Lasagna L.*, *Casalini A. G.*, *Adcock I. M.*, *Casolari P.*, *Contoli M.*, *Tafuro F.*, *Padovani A.*, *Chung K. F.*, *Barnes P. J.*, *Papi A.*, *Rindi G.*, *Bertorelli G. 2011*. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy. PLoS ONE. 6 (7) : e22637.

Chen X., *Oppenheim J. J. 2014*. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. J. Leukoc. Biol. 95 : 723—731.

Coskun M., *Salem M.*, *Pedersen J.*, *Nielsen O. H. 2013.* Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacol. Res. 76 : 1—8.

Egwuagu C. E. 2009. STAT3 in $CD4^+$ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. Cytokine. 47 (3) : 149—156.

Eisenstein E. M., *Williams C. B. 2009.* The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. Pediatr. Res. 65 : 26R—31R.

Khader S. A., *Gopal R. 2010*. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. Virulence. 1 : 423—427.

Laurence A., *Tato C. M.*, *Davidson T. C.*, *Kanno Y.*, *Chen Z.*, *Yao Z.*, *Blank R. B.*, *Meylan F.*, *Siegel R.*, *Hennighausen L.*, *Shevach E. M.*, *O'shea J. J. 2007*. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. Immunity. 26 : 371—381.

Lee D. C., *Harker J. A.*, *Tregoning J. S.*, *Atabani S. F.*, *Johansson C.*, *Schwarze J.*, *Openshaw P. J. 2010.* $CD25^+$ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection. J. Virol. 84 : 8790—8798.

Li L., *Qiao D.*, *Fu X.*, *Lao S.*, *Zhang X.*, *Wu C. 2011*. Identification of *Mycobacterium tuberculosis*-specific Th1, Th17 and Th22 cells using the expression of CD40L in tuberculous pleurisy. PLoS ONE. 6 : e20165.

Liu Y., *Yu S.*, *Li Z.*, *Ma J.*, *Zhang Y.*, *Wang H.*, *Yang B.*, *Wu C. 2013*. TGF-β enhanced IL-21-induced differentiation of human IL-21-producing CD4+ T cells via Smad3. PLoS ONE. 8 (5) : e64612.

McAleer J. P., *Kolls J. K. 2014*. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. Immunol. Rev. 260 (1) : 129—144.

Miossec P., *Kolls J. K. 2012.* Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. Nat. Rev. Drug Discov. 11 : 763—776.

Sakaguchi S., *Miyara M.*, *Costantino C. M.*, *Hafler D. A.* 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat. Rev. Immunol. 10 (7) : 490—500.

Tesmer L. A., *Lundy S. K.*, *Sarkar S.*, *Fox D. A. 2008*. Th17 cells in human disease. Immunol. Rev. 223 : 87—113.

Yang J., *Yang X.*, *Zou H.*, *Chu Y.*, *Li M. 2011.* Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. Rheumatology. 50 : 1366—1372.

Zheng S. G. 2013. Regulatory T cells vs Th17 : differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive. Amer. J. Clin. Exp. Immunol. 2 : 94—106.

Поступила 23 VII 2014

EXPRESSION OF mRNA TRANSCRIPTION FACTORS RORC2 AND FoxP3 IN LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

T. E. Kononova,[1, *] *O. I. Urazova*,[1] *V. V. Novitskiy*,[1, 2] *E. G. Churina*,[1] *P. A. Zakharova*[1]

[1] State Budget Educational Institution of High Professional Education «Siberian State Medical University» of Ministry of Health Care of the Russian Federation, Tomsk, and [2] National Research Tomsk State University; * e-mail: kononova.te@gmail.com

Homeostasis of subpopulations Th17- and Treg-lymphocytes plays an important role in a holistic and coordinated process of eradication of pathogens and preventing the spread of infection in the body. Study of molecular mechanisms controlling the balance of these cells in the formation of immune deviation in the pathogenesis of infection are particularly relevant. The article presents the results of a study of mRNA expression of transcription factors Th17- and Treg-lymphocytes — RORC2 and FoxP3, respectively, as well as the presence of these cells in peripheral blood in infectious disease (based on an example of infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*). It was established that during the infiltrative (regardless of drug susceptibility testing) and disseminated drug-susceptible pulmonary tuberculosis accompanied by Th17-polarized differentiation of T-lymphocytes, as evidenced by the increased number of $CD4^+CD161^+IL17A^+$ cells in the blood in association with increased mRNA expression of the transcription factor RORC2 in lymphocytes. In disseminated drug-resistant pulmonary tuberculosis T-lymphocyte differentiation is carried out mainly in the direction of immunosuppressive Treg-cells, as evidenced by the increase in their number in the blood in association with elevated levels of mRNA expression of the transcription factor FoxP3 in lymphocytes.

Key words: transcription factors, RORC2, FoxP3, Th17-lymphocytes, Treg-lymphocytes, pulmonary tuberculosis.