

## Сигнальный путь Notch в развитии дисбаланса иммунных реакций у больных диссеминированным туберкулезом легких

Санина А.Е., Серебрякова В.А., Уразова О.И., Гаджиев А.А.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Определить роль сигнального пути Notch в регуляции баланса Th1/Th2-лимфоцитов у больных диссеминированным лекарственно-чувствительным (ЛЧ) и лекарственно-устойчивым (ЛУ) туберкулезом легких (ТЛ).

**Материалы и методы.** Из венозной крови 13 пациентов с диссеминированным ТЛ мононуклеарные лейкоциты выделяли методом градиентного центрифугирования. Клетки культивировали в течение 72 ч в полной питательной среде при 5%-м CO<sub>2</sub> и температуре 37 °С, предварительно добавляя в инкубационную среду антигены микобактерий туберкулеза CFP10-ESAT6 или ингибитор  $\gamma$ -секретазы DAPT (5 мкМ/л; 10 мкМ/л) вместе с антигенами CFP10-ESAT6. Иммунофенотипирование Th1- и Th2-лимфоцитов проводили методом проточной лазерной многоцветной цитофлуориметрии посредством определения экспрессии рецептора CD4 и внутриклеточных транскрипционных факторов T-bet и GATA-3.

**Результаты.** У больных диссеминированным ЛЧ и ЛУ ТЛ установлено увеличение количества Th1- и Th2-лимфоцитов в интактных культурах. Стимуляции клеток антигенами микобактерий CFP10-ESAT6 способствовала повышению числа CD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup> клеток во всех группах сравнения. Добавление в инкубационную среду антигенов CFP10-ESAT6 и DAPT (10 мкМ/л) сопровождалось уменьшением количества Th2-лимфоцитов у больных ТЛ обеих групп. Повышение числа Th1-клеток регистрировалось только у пациентов с ЛЧ ТЛ. Подавление сигнального пути Notch с помощью ингибитора  $\gamma$ -секретазы – DAPT (10 мкМ/л) приводило к повышению коэффициента соотношения Th1/Th2-лимфоцитов как при ЛЧ, так и при ЛУ вариантах заболевания.

**Заключение.** Сигнальный путь Notch оказывает модулирующее действие на дифференцировку ключевых популяций лимфоцитов, определяющих динамический баланс клеточно-опосредованных и гуморальных реакций противотуберкулезного иммунитета. Угнетение молекулярного каскада Notch ингибитором  $\gamma$ -секретазы DAPT (10 мкМ/л) в условиях *in vitro* способствует увеличению коэффициента соотношения Th1/Th2 у больных диссеминированным ЛЧ и ЛУ ТЛ. Положительное регулирующее действие на баланс Th1/Th2-клеток позволяет рассматривать сигнальный путь Notch в качестве перспективной потенциальной мишени в разработке новых подходов к патогенетической терапии туберкулеза.

**Ключевые слова:** Notch-сигнальный путь, туберкулез легких, лимфоциты,  $\gamma$ -секретазы, Т-хелперы

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках плановой темы НИР Сибирского государственного медицинского университета по программе САЕ «Молекулярная медицина» (Молекулярно-клеточные основы воспаления при социально значимой патологии).

**Соответствие принципам этики.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 7924 от 14.10.2019).

✉ Серебрякова Валентина Александровна, serebryakova-val@mail.ru

Для цитирования: Санина А.Е., Серебрякова В.А., Уразова О.И., Гаджиев А.А. Сигнальный путь Notch в развитии дисбаланса иммунных реакций у больных диссеминированным туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(4):92–99. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-92-99>.

## Notch signaling pathway in the development of imbalanced immune responses in patients with disseminated pulmonary tuberculosis

Sanina A.E., Serebryakova V.A., Urazova O.I., Gadzhiev A.A.

Siberian State Medical University  
2 Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To determine the role of the Notch signaling pathway in the regulation of Th1 / Th2 lymphocyte balance in patients with disseminated drug-sensitive (DS) and drug-resistant (DR) pulmonary tuberculosis (PT).

**Materials and methods.** Mononuclear leukocytes were isolated from the venous blood of 13 patients with disseminated PT by density gradient centrifugation. The cells were cultured for 72 h in the complete cell culture medium at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C. Preliminarily, CFP10 and ESAT6 mycobacterial antigens or  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (5  $\mu$ M / l; 10  $\mu$ M / l) together with CFP10 and ESAT6 antigens were added to the culture medium. Immunophenotyping of Th1 and Th2 lymphocytes was performed by multicolor flow cytometry by determining the expression of CD4 receptor and intracellular transcription factors T-bet and GATA-3.

**Results.** In patients with disseminated DS and DR PT, an increase in the number of Th1 and Th2 lymphocytes was found in intact cultures. Stimulation of cells with mycobacterial antigens CFP10 and ESAT6 resulted in an increase in the number of CD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup> cells in all comparison groups. Addition of CFP10 and ESAT6 antigens and DAPT (10  $\mu$ M / l) to the incubation medium was accompanied by a decrease in the number of Th2 lymphocytes in PT patients in both groups. A rise in the number of Th1 cells was registered only in patients with DS PT. Suppression of the Notch signaling pathway with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (10  $\mu$ M / l) resulted in an increase in the Th1 / Th2 lymphocyte balance in both DS and DR variants of the disease.

**Conclusion.** The Notch signaling pathway has a modulating effect on the differentiation of the key lymphocyte populations that determine the balance between cell-mediated and humoral immune responses to PT. Suppression of the Notch signaling cascade by the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (10  $\mu$ M / l) *in vitro* promotes an increase in the Th1 / Th2 ratio in patients with disseminated DS and DR PT. The positive regulatory effect on the Th1 / Th2 lymphocyte balance allows to consider the Notch signaling pathway as a promising potential target in the development of new approaches to the pathogen-specific therapy for PT.

**Keywords:** Notch signaling pathway, pulmonary tuberculosis, lymphocytes,  $\gamma$ -secretase, helper T cells

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The study was performed within the planned research topic of Siberian State Medical University under the program “Molecular medicine” (Molecular and cellular basis of inflammation in socially sensitive pathology).

**Conformity with the principles of ethics.** All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Siberian State Medical University (Protocol No 7924 of 14.10.2019).

**For citation:** Sanina A.E., Serebryakova V.A., Urazova O.I., Gadzhiev A.A. Notch signaling pathway in the development of imbalanced immune responses in patients with disseminated pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(4):92–99. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-4-92-99>.

## ВВЕДЕНИЕ

В основе прогрессирующего течения туберкулезной инфекции лежит гиперергическая воспалительная реакция с участием широкого спектра иммунокомпетентных клеток [1, 2]. Популяция Th2-лимфоцитов, регулирующая развитие антитело-опосредованных реакций иммунитета, в кооперации с Th1-клетками участвует в формировании протективного ответа [3, 4] и, напротив, может способствовать иммуноопосредованному повреждению тканей и персистенции микобактерий [5, 6]. Установлено, что более тяжелое течение туберкулеза легких ассоциировано с увеличением концентрации в крови мРНК IL-4 [6, 7], высокими титрами антиген-специфических IgG и повышенной экспрессией мРНК супрессора цитокиновой сигнализации SOCS3 [7].

Множественные взаимодействия между клетками иммунной системы детерминируются не только цитокинами и хемокинами (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-12, IL-27 и др.), но и лиганд-рецепторными взаимодействиями [8, 9]. Определяющую позицию среди рецепторных механизмов кооперации занимают лиганды и рецепторы Notch, связанные с внутриклеточным сигнальным каскадом реакций, регулирующих дифференцировку клеток [10]. Дисфункция молекулярных механизмов сигнального пути Notch на любом этапе реализации (экспрессия рецепторов, лигандов, активность ферментов и т.д.) может вносить вклад в нарушение формирования эффективного иммунного ответа против микобактерий туберкулеза и способствовать прогрессирующему течению заболевания. Так, в экспериментах на макрофагах мышей установлено, что индуцированное BCG увеличение экспрессии белка рецептора Notch1 и последующая активация его сигнального пути приводят к повышению экспрессии белка SOCS3, обеспечивающего негативный контроль передачи сигналов цитокинов [11]. Продемонстрированное у больных туберкулезом увеличение экспрессии лейкоцитами молекул, инициирующих сигнальный каскад Notch – мРНК Notch1/2 и DLL4, без изменения экспрессии их генов-мишеней (Hes1, Hey1) [12] оставляет открытым вопрос о роли сигнального пути Notch в иммунопатогенезе туберкулеза.

Одним из молекулярных подходов, позволяющих оценить участие сигнального каскада Notch в патогенезе различных иммуноопосредованных заболеваний, является подавление активности  $\gamma$ -секретазы – ключевого протеолитического фермента, инициирующего высвобождение внутриклеточного домена Notch-рецептора [13]. В качестве потенциального лекарственного средства для лечения онкологических,

неврологических, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний активно изучаются свойства ингибитора  $\gamma$ -секретазы – DAPT (N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-1-аланил]-s-фенилглицин-бутиловый эфир) [14].

Цель исследования. Определить роль сигнального пути Notch в регуляции баланса Th1- и Th2-лимфоцитов у больных диссеминированным лекарственно-чувствительным (ЛЧ) и лекарственно-устойчивым (ЛУ) туберкулезом легких (ТЛ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 13 пациентов с впервые выявленным диссеминированным ТЛ (средний возраст  $47,3 \pm 5,21$  лет), находившихся на стационарном лечении в ОГАУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр».

Пациенты были разделены на две группы в зависимости от чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным средствам: первая группа – 7 пациентов, выделяющих микобактерии, резистентные к одному и более противотуберкулезным средствам (изониазиду и рифампицину); вторую – 6 пациентов, выделяющих лекарственно-чувствительные микобактерии. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев с сопоставимыми характеристиками по возрасту и полу.

Материалом исследования служила цельная венозная кровь, взятая до начала лечения противотуберкулезными средствами. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови методом градиентного центрифугирования ( $\rho = 1,077$  г/мл). В среду для инкубации вносили антигены микобактерий туберкулеза (АГ) CFP10-ESAT6 («Диаскинтест», Generium, Россия) в дозе 10 мкг/мл или ингибитор  $\gamma$ -секретазы DAPT (Tocris Bioscience, Великобритания) в дозе 5 или 10 мкМ/л, предварительно растворенный в 0,1%-м растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США), в комбинации с АГ CFP10-ESAT6. Указанная доза была определена при оценке цитотоксичности аллергена туберкулезного рекомбинантного CFP10/ESAT-6 МТТ-тестом. ДМСО и ингибитор  $\gamma$ -секретазы в указанных концентрациях не вызывали гибели клеток в условиях *in vitro*.

Для культивирования клеток использовали питательную среду RPMI-1640 с L-глутамином (ООО «БиолоТ», Россия); клетки инкубировали в газовой среде 5%-го CO $_2$  при 37 °C в течение 72 ч. Иммунофенотипирование Th1- и Th2-лимфоцитов проводили методом проточной лазерной многоцветной цитометрии путем определения экспрессии поверхностного рецептора CD4 (FITC, BD Biosciences, США) и внутриклеточных транскрипционных факторов – T-bet

(Alexa Fluor 405, R&D Systems Inc., США) и GATA-3 (PerCP-eFluor 710, BD Biosciences, США).

Полученный статистический материал обрабатывали в пакете прикладных программ IBM SPSS statistics 25 (Statistical Package for the Social Sciences, США) и Microsoft Office 2013. Тест Шапиро – Уилка использовали для проверки соответствия выборочных данных нормальному распределению. В качестве средних выборочных характеристик вычисляли медиану и интерквартильный размах  $Me (Q_1-Q_3)$ , так как количественные параметры в группах исследования не подчинялись нормальному закону распределения. Непараметрический  $U$ -критерий Манна – Уитни использовали для оценки уровня статистической значимости различий количественных показателей между исследуемыми выборками. Критерий

Вилкоксона применяли для оценки значимости различий зависимых данных внутри группы. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенное исследование показало, что развитие диссеминированного туберкулеза легких сопровождалось увеличением количества клеток  $CD4^+T\text{-bet}^+$ . Так, у больных ЛЧ формой заболевания число Th1-лимфоцитов превышало аналогичные показатели у здоровых доноров в 2 раза ( $p < 0,01$ ), а у пациентов с ЛУ ТЛ – в 1,7 раза ( $p < 0,01$ ). Содержание Th2-лимфоцитов в интактных культурах у больных ТЛ с разными видами устойчивости микобактерий было в 2,5 раза выше ( $p < 0,001$ ), чем у здоровых лиц (табл. 1).

Таблица 1

Относительное содержание Th1- и Th2-лимфоцитов в периферической крови (% от общего числа лимфоцитов) у больных диссеминированным туберкулезом легких, $Me (Q_1-Q_3)$			
Показатель	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Th1-лимфоциты ( $CD4^+T\text{-bet}^+$ )			
Интактная культура	1,25 (1,12–1,37)	2,51 (2,48–2,59) $p_1 < 0,001$	2,19 (2,17–2,22) $p_1 < 0,001$ $p_4 = 0,008$
С добавлением АГ (CFP10-ESAT6)	1,30 (1,18–1,42) $p_2 = 0,012$	2,54 (2,51–2,66) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,041$	2,34 (2,31–2,34) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$ $p_4 = 0,008$
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	1,37 (1,21–1,44) $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,012$	2,56 (2,52–2,64) $p_1 < 0,001$	2,30 (2,27–2,31) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,042$ $p_4 = 0,008$
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	1,95 (1,7–2,04) $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,012$	2,68 (2,63–2,73) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$ $p_3 = 0,043$	2,34 (2,29–2,37) $p_1 < 0,001$ $p_4 = 0,008$
Th2-лимфоциты ( $CD4^+GATA-3^+$ )			
Интактная культура	1,04 (0,99–1,01)	2,57 (2,49–2,63) $p_1 < 0,001$	2,67 (2,65–2,69) $p_1 < 0,001$
С добавлением АГ (CFP10-ESAT6)	1,12 (1,08–1,14) $p_2 = 0,012$	2,73 (2,64–2,73) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$	2,70 (2,68–2,71) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$
С добавлением АГ и DAPT (5 мкМ/л)	0,91 (0,82–0,98) $p_3 = 0,012$	2,65 (2,61–2,65) $p_1 < 0,001$	2,68 (2,62–2,69) $p_1 < 0,001$
С добавлением АГ и DAPT (10 мкМ/л)	0,68 (0,63–0,72) $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,012$	2,19 (2,18–2,21) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$ $p_3 = 0,043$	2,18 (2,13–2,19) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,043$ $p_3 = 0,043$

Примечание (здесь и в табл. 2):  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – в интактной культуре;  $p_3$  – при стимуляции антигенами (АГ);  $p_4$  – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; DAPT – N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester – N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицин трет-бутиловый эфир.

После стимуляции клеток антигенами микобактерий CFP10-ESAT6 во всех исследуемых группах регистрировалось увеличение количества Th1- и Th2-клеток.

Анализ популяционного состава лимфоцитов у больных ЛЧ и ЛУ ТЛ после последовательного добавления в интактные культуры ингибитора  $\gamma$ -секретазы (DAPT) в концентрации 5 мкМ/л в комплексе с антигенами CFP10-ESAT6 не позволил установить значимых различий с соответствующими данными, полученными при стимуляции клеток только антигенами. У здоровых доноров регистрировалось статистически значимое ( $p = 0,012$ ) снижение числа  $CD4^+GATA-3^+$  и увеличение количества  $CD4^+T-bet^+$  лимфоцитов (см. табл. 1).

Повышение концентрации DAPT до 10 мкМ/л приводило к уменьшению доли Th2-клеток в культурах клеток у больных ТЛ обеих групп ( $p = 0,043$ ) и здоровых доноров ( $p = 0,012$ ). Изменения числа  $CD4^+T-bet^+$ -лимфоцитов были неоднозначными. Так, повышение числа Th1-клеток регистрировалось только у пациентов с ЛЧ ТЛ ( $p = 0,043$ ) и в группе контроля ( $p = 0,012$ ). У больных ЛУ ТЛ

количество  $CD4^+T-bet^+$ -лимфоцитов было сопоставимым с аналогичными показателями, полученными в условиях инкубации клеток с антигенами CFP10-ESAT6.

Сравнение полученных результатов между группами больных ТЛ показало, что во всех применяемых условиях культивирования число Th1-лимфоцитов у пациентов с ЛУ-вариантом заболевания было ниже ( $p = 0,008$ ), чем у больных, инфицированных микобактериями, чувствительными к основным противотуберкулезным средствам.

Расчет коэффициента соотношения популяций лимфоцитов Th1/Th2 позволил установить статистически значимые различия для показателей, полученных при инкубации мононуклеарных лейкоцитов с АГ CFP10-ESAT6 и DAPT (10 мкМ/л). Угнетение сигнального пути Notch приводило к повышению индекса соотношения Th1/Th2-клеток относительно интактной и стимулированной CFP10-ESAT6 культур у больных ТЛ ( $p_3 = 0,043$ ) и у здоровых доноров ( $p_3 = 0,012$ ). Статистически значимых различий между группами больных с разной чувствительностью микобактерий не установлено (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение популяций Th1- и Th2-лимфоцитов у больных диссеминированным туберкулезом легких, Me ( $Q_1-Q_3$ ), %			
Индекс соотношения Th1/Th2	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Исходный	1,2 (1,13–1,25)	0,96 (0,94–0,97)	0,93 (0,88–0,95)
При стимуляции антигенами (CFP10-ESAT6)	1,16 (1,09–1,24)	0,96 (0,95–0,99)	0,95 (0,94–0,95)
При добавлении антигенов и DAPT (10 мкМ/л)	2,88 (2,68–2,82)	1,27 (1,21–1,28)	1,25 (1,24–1,25)
	$p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,012$	$p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,043$ $p_3 = 0,043$	$p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,043$ $p_3 = 0,043$

## ОБСУЖДЕНИЕ

Протективный контроль над инфекционным процессом, вызванным микобактериями туберкулеза, обеспечивается кооперативным взаимодействием множества иммунокомпетентных клеток, реализуемым через юстакринные и паракринные механизмы. Роль основной популяции, обеспечивающей развитие адаптивного иммунного ответа, принадлежит пулу антиген-специфических  $CD4^+$  Т-лимфоцитов [15]. Их решающее значение в патогенезе туберкулеза легких определяется способностью повышать фагоцитарную активность макрофагов [16], индуцировать хемокин-опосредованную миграцию  $CD8^+$  Т-клеток, их цитолитическую активность, секрецию ими цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и гранзимов [15], а также подтверждается высоким риском развития заболевания у ВИЧ-инфицированных пациентов [15, 17, 18].

Установленное повышение доли Th1- и Th2-лимфоцитов в интактных культурах больных туберкулезом свидетельствует о комплексном вовлечении реакций клеточного и гуморального иммунитета в развитие протективного ответа против микобактерий. Диссеминированный характер течения туберкулезного воспаления указывает на несостоятельность реакций, направленных на сдерживание первичной микобактериальной инфекции. В качестве одного из факторов, способствующих прогрессирующему течению патологического процесса, может рассматриваться увеличение числа Treg и Th2-клеток.

Ключевую роль в развитии туберкулезной инфекции играют высокоспецифичные молекулы ESAT6 и CFP10, секретируемые только делящимися *Mycobacterium tuberculosis* [19]. Белок ESAT-6 обладает литической активностью, способствует проникновению возбудителя в клетку и дестабили-

зирует фагосомы, позволяя микобактериям выйти в цитозоль макрофага и избежать лизиса. Антиген CFP-10 образует комплекс с ESAT-6 и обеспечивает его доставку к месту действия [20]. Единый рекомбинантный белок CFP10-ESAT6 предназначен для оценки клеточно-опосредованного иммунного ответа на микобактерии туберкулеза. Зарегистрированное во всех исследуемых пробах повышение количества Th1- и Th2-лимфоцитов в ответ на стимуляцию культур антигенами микобактерий CFP10-ESAT6 является отражением физиологического ответа клеток и может свидетельствовать в пользу сохранения функции распознавания антигена и относительно эффективной межклеточной кооперации.

Вопрос функционального значения Th2-лимфоцитов в патогенезе прогрессирующего течения туберкулеза остается открытым. Классические реакции антитело-опосредованного иммунного ответа – опсонизация, активация комплемента, фагоцитоз, лизосомальная деградация – потенциально могут быть эффективными против микобактерий туберкулеза [3]. Ведущим цитокином гуморального иммунного ответа является IL-4, продуцируемый Th2-лимфоцитами. Молекулярные механизмы участия IL-4 в реакциях иммунитета связаны с подавлением TNF $\alpha$ -индуцированного апоптоза инфицированных клеток, снижением активности iNOS, усилением пролиферации антиген-специфических регуляторных T-лимфоцитов [5]. В работах отечественных [21, 22] и зарубежных [23–25] авторов установлено, что ключевым звеном иммунного дисбаланса при туберкулезной инфекции является поляризация иммунного ответа в направлении Treg- и Th2-зависимых реакций. Вероятно, ключевое значение имеет интенсивность напряжения функциональной активности Th2-лимфоцитов, а также титр и спектр образуемых плазматическими клетками антител. Ввиду этого установленное уменьшение доли Th2-лимфоцитов в культурах клеток больных ТЛ обеих групп при действии DAPT (10 мкМ/л) с параллельным увеличением числа Th1-клеток при ЛЧ ТЛ может рассматриваться в качестве возможного механизма, способствующего восстановлению эффективного динамического равновесия между основными популяциями, регулирующими интенсивность деструктивных процессов и обеспечивающими протективный контроль над распространением инфекции.

Зафиксированное и сохраняющееся в различных условиях эксперимента более низкое (чем при ЛЧ ТЛ) количество Th1-лимфоцитов у больных с ЛУ ТЛ свидетельствует в пользу значительных нарушений

молекулярных механизмов межклеточной кооперации, индуцируемых в том числе устойчивыми штаммами микобактерий. Установлено, что развитие ЛУ ТЛ ассоциировано со значительным увеличением числа и активности иммуносупрессорных регуляторных T-клеток (Treg), продукции ими IL-10, дефицитом NK-лимфоцитов, IFN $\gamma$  и основного фактора, обеспечивающего пролиферацию антиген-специфических лимфоцитов – IL-2 [24, 26]. Поэтому возможной причиной исходно более низкого количества Th1-лимфоцитов у больных ЛЧ ТЛ в интактной культуре и сохранения этой динамики при стимуляции клеток антигенами могли быть индуцированные лекарственно-устойчивыми микобактериями механизмы нарушений реакций клеточного иммунитета, способствующие персистенции возбудителя и прогрессии заболевания.

Соотношение популяций Th1/Th2 в определенной степени отражает иммунный паттерн T-лимфоцитов [4, 27]. Применительно к микобактериальной инфекции преобладание Th1-клеток и клеточно-опосредованных реакций обеспечивает эффективную защиту от возбудителя, преобладание Th2-лимфоцитов и гуморальных реакций – развитие гиперергических реакций с иммуноопосредованным повреждением тканей. Установленное у больных ТЛ повышение коэффициента соотношения Th1/Th2-клеток под действием DAPT (10 мкМ/л) относительно интактной и стимулированной антигенами культур (а также их соответствие исходным показателям у здоровых доноров) может рассматриваться в качестве возможного механизма, регулирующего восстановление баланса популяций лимфоцитов через угнетение сигнального пути Notch, что может способствовать более эффективному развитию иммунного ответа и замедлению деструктивных процессов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сигнальный путь Notch оказывает модулирующее действие на дифференцировку ключевых популяций лимфоцитов, определяющих динамический баланс клеточно-опосредованных и гуморальных реакций. Угнетение молекулярного каскада Notch ингибитором  $\gamma$ -секретазы DAPT (в дозе 10 мкМ/л) в условиях *in vitro* способствует увеличению коэффициента соотношения Th1/Th2 у больных диссеминированным ЛЧ и ЛУ ТЛ. Положительное регулирующее действие на баланс Th1/Th2-клеток позволяет рассматривать сигнальный путь Notch в качестве перспективной потенциальной мишени патогенетической терапии туберкулеза. Оценка вклада молекулярного пути Notch в регуляцию дифференцировки других популяций T-лимфоцитов (Th17, Treg),

принимающих участие в иммунопатогенезе туберкулеза, требует дальнейших исследований.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Кононова Т.Е., Воронова Г.А. Макрофаги и противотуберкулезный иммунитет (обзор литературы). *Вестник Томского государственного университета*. 2021;26:32–59. DOI: 10.17223/24135542/26/3.
2. Davis A.G., Rohlwick U.K., Proust A., Figaji A.A., Wilkinson R.J. The pathogenesis of tuberculous meningitis. *J. Leukoc. Biol.* 2019;105(2):267–280. DOI: 10.1002/JLB.MR0318-102R.
3. Achkar J.M., Chan J., Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol. Rev.* 2015;264(1):167–181. DOI: 10.1111/imr.12276.
4. Abebe F. Synergy between Th1 and Th2 responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection: A review of current understanding. *Int. Rev. Immunol.* 2019;38(4):172–179. DOI: 10.1080/08830185.2019.1632842.
5. Rook G.A. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr. Mol. Med.* 2007;7(3):327–337. DOI: 10.2174/156652407780598557.
6. Pooran A., Davids M., Nel A., Shoko A., Blackburn J., Dheda K. IL-4 subverts mycobacterial containment in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages. *Eur. Respir. J.* 2019;54(2):1802242. DOI: 10.1183/13993003.02242-2018.
7. Ashenafi S., Aderaye G., Bekele A., Zewdie M., Aseffa G., Hoang A.T. et al. Progression of clinical tuberculosis is associated with a Th2 immune response signature in combination with elevated levels of SOCS3. *Clin. Immunol.* 2014;151(2):84–99. DOI: 10.1016/j.clim.2014.01.010.
8. Burt P., Peine M., Peine C., Borek Z., Serve S., Floßdorf M. et al. Dissecting the dynamic transcriptional landscape of early T helper cell differentiation into Th1, Th2, and Th1/2 hybrid cells. *Front. Immunol.* 2022;13:928018. DOI: 10.3389/fimmu.2022.928018.
9. Joseph A.M., Monticelli L.A., Sonnenberg G.F. Metabolic regulation of innate and adaptive lymphocyte effector responses. *Immunol. Rev.* 2018;286(1):137–147. DOI: 10.1111/imr.12703.
10. Verma N.K., Fazil M.H., Ong S.T., Chalasani M.L., Low J.H., Kottaiswamy A. et al. LFA-1/ICAM-1 ligation in human T cells promotes Th1 polarization through a GSK3 $\beta$  signaling-dependent notch pathway. *J. Immunol.* 2016;197(1):108–118. DOI: 10.4049/jimmunol.1501264.
11. Narayana Y., Balaji K.N. NOTCH1 up-regulation and signaling involved in *Mycobacterium bovis* BCG-induced SOCS3 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2008;283(18):12501–12511. DOI: 10.1074/jbc.M709960200.
12. Li Q.F., He X.Y., Xin T. Role of the Notch signaling pathway in children with tuberculosis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2019;21(10):1012–1015. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.10.011.
13. Wen J., Liu D., Zhao L. Small molecules targeting  $\gamma$ -secretase and their potential biological applications. *Eur. J. Med. Chem.* 2022;232:114169. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114169.
14. Dong Z., Huo J., Liang A., Chen J., Chen G., Liu D. Gamma-secretase inhibitor (DAPT), a potential therapeutic target drug, caused neurotoxicity in planarian regeneration by inhibiting Notch signaling pathway. *Sci. Total Environ.* 2021;781:146735. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146735.
15. Lu Y.J., Barreira-Silva P., Boyce S., Powers J., Cavallo K., Behar S.M. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell Rep.* 2021;36(11):109696. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109696.
16. Narinyan W., Poladian N., Orujyan D., Gargaloyan A., Venketaraman V. Immunologic role of innate lymphoid cells against *Mycobacterial tuberculosis* infection. *Biomedicines.* 2022;10(11):2828. DOI: 10.3390/biomedicines10112828.
17. Amelio P., Portevin D., Hella J., Reither K., Kamwela L., Lweno O. et al. HIV infection functionally impairs *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 and CD8 T-cell responses. *J. Virol.* 2019;93(5):e01728–18. DOI: 10.1128/JVI.01728-18.
18. Letang E., Ellis J., Naidoo K., Casas E.C., Sánchez P., Hassan-Moosa R. et al. Tuberculosis-HIV co-infection: progress and challenges after two decades of global antiretroviral treatment roll-out. *Arch. Bronconeumol.* 2020;56(7):446–454. DOI: 10.1016/j.arbr.2019.11.013.
19. Кудлай Д.А. Гибридные белки CFP10 и ESAT6. Путь от разработки молекулы до скрининга населения на туберкулезную инфекцию. *Иммунология.* 2021;42(2):166–174. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-166-174.
20. Кудлай Д.А., Докторова Н.П. Антигены ESAT-6 и CFP-10 как субстрат биотехнологической молекулы. Возможности применения в медицине. *Инфекция и иммунитет.* 2022;12(3):439–449. DOI: 10.15789/2220-7619-ЕАС-1763.
21. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е., Кононова Т.Е., Филинюк О.В. и др. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016;15(5):166–177. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-5-166-177.
22. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskii V.V., Churina E.G., Zakharova P.A. Expression of transcription factors RORC2 and FoxP3 mRNA in lymphocytes of patients with pulmonary tuberculosis. *Cell Tiss. Biol.* 2015;9:167–172. DOI: 10.1134/S1990519X15030062.
23. He X.Y., Xiao L., Chen H.B., Hao J., Li J., Wang Y.J. et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;29(6):643–650. DOI: 10.1007/s10096-010-0908-0.
24. Fan R., Xiang Y., Yang L., Liu Y., Chen P., Wang L. et al. Impaired NK cells' activity and increased numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* patients. *Tuberculosis (Edinb.).* 2016;98:13–20. DOI: 10.1016/j.tube.2016.02.001.
25. Zhang J.A., Lu Y.B., Wang W.D., Liu G.B., Chen C., Shen L. et al. BTLA-expressing dendritic cells in patients with tuberculosis exhibit reduced production of IL-12/IFN- $\alpha$  and

- increased production of IL-4 and TGF- $\beta$ , favoring Th2 and Foxp3<sup>+</sup> Treg polarization. *Front. Immunol.* 2020;11:518. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00518.
26. Tan Q., Xie W.P., Min R., Dai G.Q., Xu C.C., Pan H.Q. et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012;31(6):1233–1242. DOI: 10.1007/s10096-011-1434-4.
27. Jia F., Zhao Q., Shi P., Liu H., Zhang F. Dupilumab. Advances in the off-label usage of IL4/IL13 antagonist in dermatoses. *Dermatol. Ther.* 2022;35(12):e15924. DOI: 10.1111/dth.15924.

## Информация об авторах

**Санина Алина Евгеньевна** – аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, beresneva0307@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9261-635X>

**Серебрякова Валентина Александровна** – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры фармакологии СибГМУ, г. Томск, serebryakova-val@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7078-4988>

**Уразова Ольга Ивановна** – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, urazova72@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

**Гаджиев Алибей Агалар оглы** – студент, лечебный факультет, СибГМУ, г. Томск, alibey050199@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1367-6942>

(✉) **Серебрякова Валентина Александровна**, serebryakova-val@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023;  
одобрена после рецензирования 18.04.2023;  
принята к публикации 25.05.2023