

## ИНТЕРФЕРОН- $\gamma$ : БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

А.А. Луцкий<sup>1</sup>, А.А. Жирков<sup>1</sup>, Д.Ю. Лобзин<sup>2</sup>, М. Рао<sup>3</sup>, Л.А. Алексеева<sup>1</sup>, М. Мейер<sup>3,4,5</sup>, Ю.В. Лобзин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Отдел терапевтической иммунологии, Департамент лабораторной медицины, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

<sup>4</sup> Департамент микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

<sup>5</sup> Центр трансплантации аллогенных стволовых клеток, Каролинский университетский госпиталь, Стокгольм, Швеция

### Interferon- $\gamma$ : biological function and application for study of cellular immune response

A.A. Lutckii<sup>1</sup>, A.A. Zhirkov<sup>1</sup>, D.Yu. Lobzin<sup>2</sup>, M. Rao<sup>3</sup>, L.A. Alekseeva<sup>1</sup>, M. Maeurer<sup>3,4,5</sup>, Yu.V. Lobzin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Science Research Institute of Children's Infection, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Division of Therapeutic Immunology (TIM), LABMED, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>4</sup> Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>5</sup> CAST, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

### Резюме

Клеточный иммунный ответ играет важную роль в борьбе с внутриклеточными патогенами, такими как вирусы, некоторые бактерии и паразиты. Оценить наличие, специфичность и напряженность клеточного ответа можно путем исследования реакции клеток иммунной системы на специфические раздражители, такие как антиген. К основным реакциям на антиген-стимуляцию относятся продукция цитокинов, пролиферация и цитотоксичность. В данном обзоре рассмотрен интерферон-гамма как один из центральных Th1 цитокинов: его биология, иммунологическая роль и использование в качестве маркера клеточного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** интерферон- $\gamma$ , ИФН- $\gamma$ , Interferon-gamma releasing assay, IGRA, Enzyme-Linked ImmunoSpots, ELISpot.

### Введение

Исследование иммунного ответа является сложной задачей. Оценить состояние клеточного звена иммунной системы можно, исследуя количественное содержание иммунных клеток, относящихся к различным функциональным классам. Существуют маркеры, позволяющие различать клетки большинства субпопуляций лимфоцитов (такие как Т-лимфоциты и их субпопуляции, В-лимфоциты, НК-клетки и многие другие). Отдельная группа маркеров позволяет выделить клетки, находящиеся на различных стадиях созревания в составе основных субпопуляций: наивные, активированные, памяти, истощенные и другие.

### Abstract

Cellular immune response plays a central role in control of intracellular pathogens like viruses, some bacteria and parasites. Evaluation of presence, specificity and strength of cellular immune response can be done by investigation of reaction of immune cells to specific stimulus, like antigen. The major cellular reactions to antigen stimulation are production of cytokines, proliferation and cytotoxicity. This review is focused on interferon-gamma as one of the central Th1 cytokines: its biology, immunological role and application as marker of cellular immune response.

**Key words:** Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ , Interferon-gamma releasing assay, IGRA, Enzyme-linked immunospot, ELISpot

Клеточный иммунный ответ связан непосредственно с клетками и не может быть исследован изолированно. Одним из подходов к его исследованию является изучение реакций клеток *in vitro* или *ex vivo* в ответ на различные раздражители. Технологии синтеза пептидных структур высокой чистоты и небольшой длины (7 – 12 аминокислот) — иммуногенных фрагментов (эпитопов) белков, компонентов различных живых организмов, дают возможность исследовать иммунную реакцию клеток на специфические стимулы.

Иммунные клетки в ответ на стимуляцию способны проявлять три основные реакции: секреция

цитокинов, цитотоксичность и пролиферация. Существуют методики, позволяющие оценить каждую из них. В данном обзоре мы остановимся на одной — секреции цитокинов в ответ на стимуляцию специфическим антигеном.

Согласно существующему представлению, тип иммунного ответа может быть классифицирован на основании продуцируемых специфическими клетками, Т-хелперами цитокинов. Т-хелперы 1 класса (Тх1) продуцируют интерлейкин (ИЛ)-2, интерферон (ИФН)- $\gamma$ , фактор некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$  и координируют клеточный иммунный ответ. Т-хелперы 2 (Тх2) класса координируют, в основном, гуморальный иммунный ответ, продуцируя ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-10 и другие цитокины. Здесь мы остановимся на рассмотрении лабораторных методов, основанных на изучении антигениндуцированной продукции интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ) в качестве маркера специфического Тх1-иммунного ответа. Вначале мы представим имеющиеся данные относительно самого ИФН- $\gamma$  — его природы и функции, поскольку без их понимания невозможно интерпретировать получаемые результаты. Затем рассмотрим примеры использования метода в лабораторной практике.

### Интерферон- $\gamma$

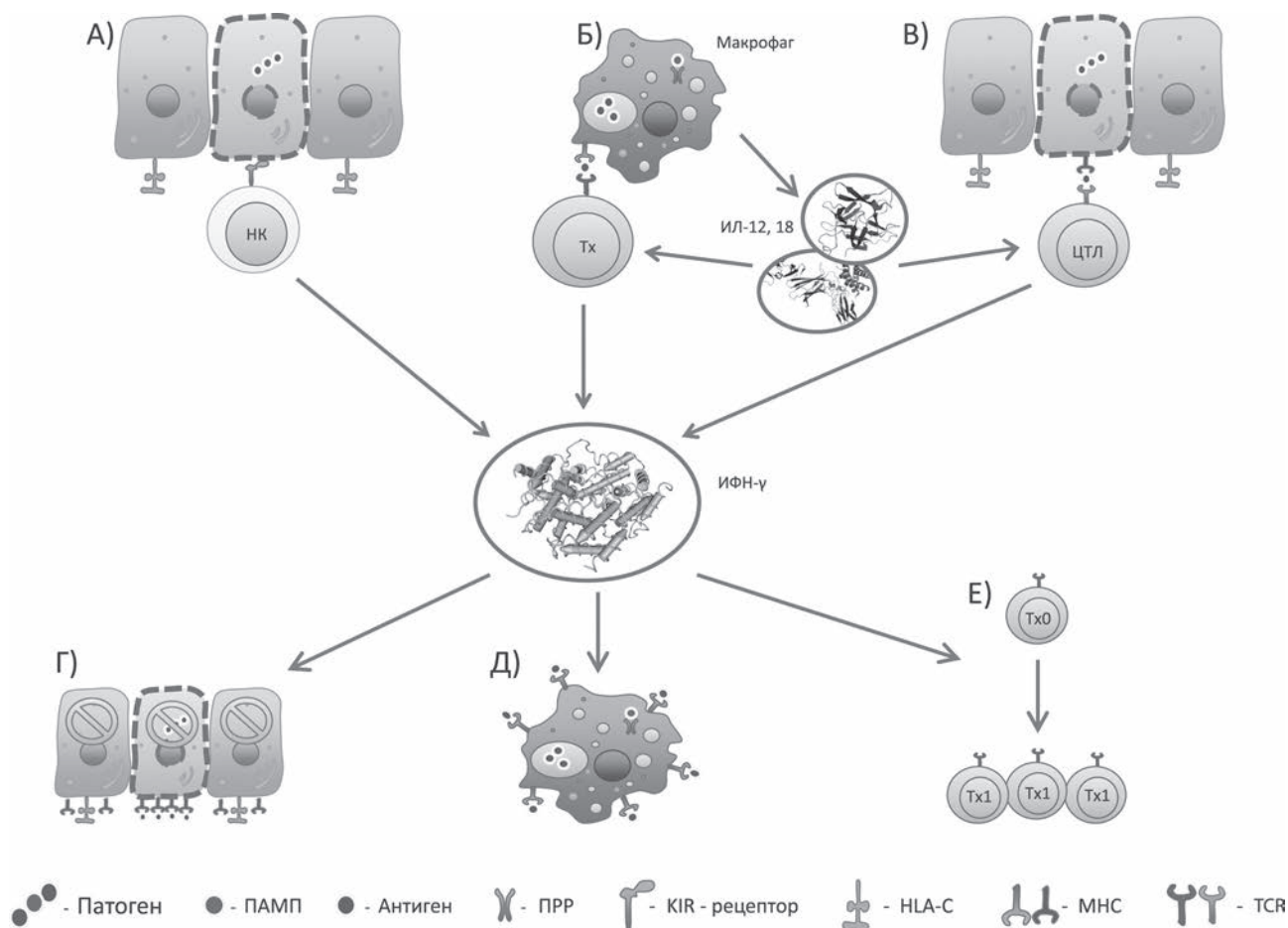
Интерфероны (от английского *to interfere*) были открыты в 1957 г. сотрудниками Лондонского национального института Айзексом и Линдерманом, изучавшими феномен интерференции вирусов [1]. Интерференция вирусов — это подавление репликации вируса в результате предшествующей инфекции другим вирусом. В своей работе авторы изучали интерференцию инактивированного нагреванием вируса гриппа с ростом живого вируса гриппа на фрагментах куриной хорион-аллантаической мембраны. Было установлено, что инкубация инактивированного вируса и мембраны приводит к выделению ранее не известного фактора, способного вызывать интерференцию. Открытый фактор получил название интерферон. В дальнейшем было установлено, что интерферон представляет собой не уникальную молекулу, а целое семейство протеинов, которое, на основании характеристик специфического рецепторного аппарата, разделено на три типа: I тип — ИФН- $\alpha/\beta$ , II тип — ИФН- $\gamma$  и III тип — ИФН- $\lambda$ . Активация рецепторов специфических к различным типам (и подтипам) интерферонов приводит к различным клеточным реакциям, определяемым профилем транскрипции интерферон-стимулированных генов и, как следствие, различной противовирусной, антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью [2]. Для ИФН I и III типов характер-

на выраженная индукция «противовирусного» состояния клеток. При этом большинство клеток способны реагировать на ИФН I типа, в то время как способностью реагировать на ИФН III типа обладают в основном клетки, подвергающиеся высокому риску инфицирования — слизистые оболочки. Таким образом, ИФН- $\lambda$  способен индуцировать выраженную противовирусную реакцию в тканях с высоким риском инфицирования, без индукции генерализованного воспалительного ответа [3].

В отличие от интерферонов I и III типов, продуцируемых различными клетками человеческого организма, в основном, в ответ на вирусную инфекцию, продукция ИФН- $\gamma$ , являющегося единственным представителем II типа интерферонов, специфична для активированных клеток иммунной системы: Тх1, цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), натуральные киллеры (НК) и антиген-презентирующие клетки (АПК) [4]. Хотя В-лимфоциты являются основными элементами гуморального иммунного ответа, недавно идентифицированные их субпопуляции, так называемые «врожденные» В-лимфоциты, также продуцируют ИФН- $\gamma$  в ответ на бактериальные инфекции, способствуя активации макрофагов и врожденного иммунного ответа [5].

У человека ген ИФН- $\gamma$  расположен на длинном плече 12 хромосомы. Зрелая мРНК ИФН- $\gamma$  имеет длину около 1,2 кб и кодирует белок молекулярной массой 17 кДа. Функциональную активность ИФН- $\gamma$  приобретает как N-гликозилированный гомодимер [6].

При инфицировании клетки внутриклеточными патогенами, такими как вирусы, в первую очередь реагирует система врожденного иммунитета. НК-клетки являются основным элементом последнего, так как для их активации не требуется специфическая антиген-стимуляция. Сигналом для активации НК служит уменьшение экспрессии специфических молекул на поверхности клеток, например, основного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I (HLA-C), происходящее при нарушении (например, вследствие репликации вируса) внутриклеточного метаболизма, а также экспрессия клетками (по тем же причинам) стресс-индуцированных молекул (рис.). Активация НК-клеток приводит к секреции ими молекул перфорина и гранзима B, осуществляющих лизис поврежденных/измененных клеток и выбросу ИФН- $\gamma$ . Следует отметить, что для НК характерна постоянная транскрипция генов, кодирующих ИФН- $\gamma$ , ведущая к постоянному присутствию внутриклеточного ИФН- $\gamma$  и способности секретировать последний непосредственно, при первичном контакте с поврежденной клеткой [7, 8].



**Рис.** Основные пути индукции и биологические эффекты IFN- $\gamma$  (схематично): А – Инфицированные патогеном клетки в результате нарушения функции снижают экспрессию молекул HLA-C на своей поверхности. HLA-C через связывание с рецептором KIR на поверхности НК угнетают активность последних. В случае отсутствия на поверхности клетки молекул HLA-C угнетения не происходит, НК активируются, вырабатывают ИФН- $\gamma$  и молекулы мембрано-атакующего комплекса. Б – Патоген или его фрагменты (ПАМП), фагоцитированные макрофагами, распознаются PRR, такими как TLR, а также подвергаются расщеплению в антиген-презентирующем компартменте макрофагов с последующей экспрессией эпитопов на поверхности в комплексе с молекулами MHC. Активация PRR вызывает продукцию макрофагами цитокинов ИЛ-12, 18, которые, в комплексе с экспрессированными эпитопами, активируют продукцию IFN- $\gamma$  (и других цитокинов) Т-хелперами. В – Белки, фрагменты внутриклеточного патогена, подвергаются деградации в протеасомах клетки. Эпитопы, продукты деградации, экспрессируются на поверхности в составе комплекса с MHC-I. Цитотоксические лимфоциты, активированные связыванием TCR на их поверхности с комплексом антиген-MHC на поверхности инфицированной клетки, в совокупности со стимуляцией интерлейкинами-12 и -18, лизируют инфицированную клетку и секретируют ИФН- $\gamma$ . Г – Клетки в ответ на активацию рецептора ИФН- $\gamma$  повышают экспрессию на своей поверхности молекул MHC и переходят в противовирусное «состояние» или подвергаются апоптозу. Д – Макрофаги в ответ на стимуляцию ИФН- $\gamma$  повышают экспрессию MHC-II на своей поверхности, повышают микробицидную активность и производят хемокины, привлекающие в очаг воспаления лимфоциты. Е – Лимфоциты Т-хелперы в ответ на стимуляцию ИФН- $\gamma$  дифференцируются в направлении Тх1. Сокращения: НК – натуральные киллеры, Тх – лимфоциты Т-хелперы, ИЛ- интерлейкин, ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты, ИФН- $\gamma$  – интерферон- $\gamma$ , ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, PRR – паттерн-распознающие рецепторы, KIR – Killer-cell Immunoglobulin like Receptor, иммуноглобулин-подобный рецептор клеток киллеров, HLA – человеческий лейкоцитарный антиген, MHC – основной комплекс гистосовместимости, TCR – Т-клеточный рецептор, TLR – Толл-рецепторы

Первичным сигналом к активации Т-лимфоцитов является связывание Т-клеточного рецептора (TCR) с комплексом антиген (АГ)-MHC на поверхности клетки (инфицированные клетки в случае MHC-I, АПК в случае MHC-II). Механизмы сигнального пути TCR детально изложены в

обзорной статье Brownlie и Zamoyska [9]. Вкратце, связывание комплекса АГ-MHC и TCR приводит к фосфорилированию внутриклеточного домена последнего, активации внутриклеточных сигнальных каскадов реакций, связанных с митоген-активируемой протеинкиназой (МАРК) и ну-

клеарного фактора каппа-В (NFκB), осуществляющих мобилизацию транскрипционных факторов генов, ответственных за рост, дифференциацию и эффекторные функции Т-клеток. Одной из таких функций является продукция различных провоспалительных цитокинов: ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-2, Тх1 и ЦТЛ, относящихся к специфическому иммунному ответу, которые в наивном состоянии не производят ИФН-γ. Для приобретения способности к антиген-индуцированной продукции цитокинов, клеткам, реализующим специфический иммунный ответ, необходимо пройти стадию активации. Следовательно, только активированные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти способны вырабатывать цитокины непосредственно при контакте с антигеном. Для активации Т-клеток, помимо связывания антигена с ТСР, необходима и цитокиновая ко-стимуляция.

ИЛ-12 и -18 являются основными ИФН-γ индуцирующими цитокинами, которые выделяют моноциты и АПК в ответ на патогены, оказавшиеся во внутриклеточном пространстве. ИЛ-12 активирует экспрессию рецептора ИЛ-18, и вместе они индуцируют транскрипцию гена ИФН-γ. Совместное действие данных цитокинов усиливает клеточно-опосредованный иммунный ответ [10, 11].

Хемокины, такие как ИФН-γ индуцируемый протеин 10 (IP-10), белок хемоаттрактант моноцитов 1 (MCP-1), хемокиновый лиганд 5 (CCL5) привлекают в очаг воспаления НК и Т-лимфоциты, а ИЛ-12 стимулирует продукцию ими ИФН-γ. Продолжающаяся стимуляция ИЛ-12 и ИЛ-18 приводит к дальнейшему усилению продукции ИФН-γ (см. рис.). Помимо ИЛ-12 и ИЛ-18, способностью активировать продукцию ИФН-γ обладает и недавно выявленный цитокин ИЛ-24 или MDA-7 (Melanoma differentiation associated 7), относящийся к семейству ИЛ-10, секретируемый активированными Т-лимфоцитами и моноцитами [12].

Ингибирующими сигналами для продукции ИФН-γ являются Тх2 цитокины: ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13, а также глюкокортикостероиды [13].

Рецептор ИФН-γ (ИФН-γR) состоит из двух субъединиц: лиганд-связывающей ИФН-γP1 и структурной ИФН-γP2. Ген, кодирующий субъединицу ИФН-γP1, у человека расположен на 6 хромосоме, ИФН-γP2 — на 21 хромосоме [14]. Рецепторы к ИФН-γ экспрессируются на поверхности практически всех клеток человеческого организма, за исключением эритроцитов. Установлено, что даже тромбоциты экспрессируют ИФН-γR в количестве порядка 300 молекул на клетку (в других тканях плотность экспрессии варьирует от 200 до 25 000 молекул на клетку). Также установлено что наибольшая экспрессия рецептора имеет место в тка-

нях, не относящихся к иммунной системе, — в коже, нервной ткани и плаценте (в 10–100 раз превышает экспрессию в селезенке и кроветворных органах) [15].

Внутриклеточная передача сигнала от ИФН-γP иницируется путём связывания димеров ИФН-γ с субъединицей ИФН-γP1, вызывая димеризацию рецептора, что, в свою очередь, активирует Янускиназу (JAK)-1 и JAK-2 [16]. JAK-1 взаимодействует с ИФН-γP1 субъединицей рецептора, а JAK-2 соответственно — с ИФН-γP2. Сигнал от активированного рецептора к ядру может передаваться посредством нескольких сигнальных каскадов.

Наиболее изученным является JAK/STAT-зависимый путь внутриклеточной сигнализации. Активация JAK-киназ приводит к фосфорилированию белка «проводник сигнала и активатор транскрипции» (STAT) 1 типа, латентного цитоплазматического транскрипционного фактора, который, димеризуясь, становится активным. Активный STAT-1 гомодимер перемещается к ядру, где активирует транскрипцию ИФН-γ активируемых (GAS) генов. На сегодняшний день известно о нескольких сотнях подобных генов, среди которых IRF1, IRF9, СИТА, iNOS-2, SOCS-1 и др. (табл.) Однако действие ИФН-γ не ограничивается транскрипцией только GAS-генов. Через продукты транскрипции GAS-генов данный цитокин регулирует транскрипцию факторов, индуцируемых ИФН I типа. Одним из них является интерферон-зависимый регуляторный фактор (IRF) — 1. Продукты его транскрипции связываются непосредственно с ИФН-стимулированными элементами (ISRE), последовательностью генов, которая является мишенью сигнального пути от ИФН-α и -β. Это свидетельствует о тесной взаимосвязи интерфероновых систем I и II типа [17].

Нарушение JAK/STAT сигнализации приводит к тяжелому иммунодефициту. В экспериментах, проведенных на мышах, нокаутированных по генам, кодирующим JAK1, JAK2 и STAT1, продемонстрировано влияние данных белков на развитие иммунного ответа [18]. Была показана повышенная чувствительность к вирусным и микобактериальным инфекциям у людей с мутациями в генах, кодирующих STAT1 и ИФН-γP [19].

Помимо классического JAK/STAT пути передачи сигнала, ИФН-γ способен активировать несколько дополнительных сигнальных каскадов, включая митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK), протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK1/2), и др. STAT-независимые пути ассоциированы с противовирусным, антипролиферативным и противоопухолевым эффектами ИФН-γ [20].

Гены, индуцируемые ИФН- $\gamma$ , и биологические функции их продуктов [13]

Ген/белок	Биологический эффект/функция
Лёгкая цепь МНС I $\beta$ 2-микροглобулин	Структурные компоненты МНС I, перемещающие чужеродные или собственные пептиды на клеточную поверхность для его распознавания цитотоксическими Т-клетками
$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ МНС II	Структурные компоненты МНС II. МНС II перемещает на клеточную поверхность чужеродные и собственные белки для распознавания CD4 + лимфоцитами
СІПА Трансактиватор основного комплекса гистосовместимости II класса	Ген белка, выступающего в качестве активатора транскрипции и контроля экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости II класса
Протеинкиназа R (PKR)	Протеинкиназа, активируемая двуцепочечной РНК, обеспечивающая состояние противовирусной активности, фактор ингибирования клеточной пролиферации
ADAR РНК специфичная аденозин деаминаза	Фермент, нарушающий функциональность двуцепочечной РНК путём конвертации аденозина в инозин
IRF-1 интерферон-зависимый регуляторный фактор 1	Фактор активации и регуляции транскрипции генов, индуцируемых IFN- $\alpha$ и IFN- $\beta$ . Регулятор апоптоза и супрессии опухоли
Каспаза 1	Протеолитический фермент, конвертер/активатор предшественников провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 и ИЛ-18)
Рецептор ФНО $\alpha$	Индукция транскрипции генов, и активация апоптоза
iNOS/NOS2 индуцируемая синтетаза оксид азота	Группа ферментов, катализирующих образование оксида азота из аргинина, кислорода и НАДФ
NRAMP1 Макрофагальный протеин, ассоциированный с естественной устойчивостью	Мембранный белок, увеличивающий естественную сопротивляемость макрофагов внутриклеточным патогенам
ИЛ-12	Фактор дифференциации CD4 + Т-клеток в сторону Th1 фенотипа. Активатор НК-клеток
Fc $\gamma$ RI Fc $\gamma$ -рецептор I	Связывание внеклеточного патогена через IgG в фазу адаптивного иммунного ответа
C2, C4, Factor B	Белки комплемента, секретируемые макрофагами и фибробластами в ответ на ИФН- $\gamma$ . Связывают внеклеточные патогены для рецептор опосредованного фагоцитоза

### Биологические эффекты ИФН- $\gamma$

К основным провоспалительным эффектам ИФН- $\gamma$  относятся:

- потенцирование активности системы интерферонов I типа;
- активация презентации антигена молекулами МНС-I и МНС-II;
- поляризация клеточного иммунного ответа в направлении Тх1;
- активация внутриклеточных противовирусных механизмов;
- контроль клеточного цикла;
- активация микробицидных механизмов клетки;
- активация продукции иммуноглобулинов IgG B- и плазматическими клетками;
- активация адгезивных свойств лейкоцитов.

Интерфероны I и II типов повышают экспрессию поверхностных молекул МНС-I, что, в свою очередь, усиливает способность цитотоксических Т-лимфоцитов распознавать антигены. Также ИФН- $\gamma$  смещает протеасомный баланс в сторону

так называемых «иммунопротеасом», что значительно увеличивает активность антигенпрезентации [21]. ИФН- $\gamma$  также индуцирует экспрессию на АПК молекул МНС-II и ко-стимулирующих молекул CD80/CD86, необходимых для презентации антигена CD4 + Т-лимфоцитам через TCR [22].

ИФН- $\gamma$  является одним из основных продуктов Тх1 CD4 + клеток. Он приводит к развитию иммунного ответа по Тх1 типу, что выражается в характерных для этого типа иммунитета клеточных реакциях. ИФН- $\gamma$ -зависимая стимуляция специфического клеточного иммунного ответа реализуется прямыми и косвенными механизмами, такими, как ингибирование Тх2 клеточной популяции в совокупности со стимуляцией процессинга и презентации антигенов, экспрессией поверхностных ко-стимулирующих молекул на АПК, и повышении дифференциации Тх0 CD4 + Т-лимфоцитов в направлении Тх1 фенотипа.

Важной функцией ИФН- $\gamma$  является вызываемое им состояние противовирусной защиты (подавление продукции белка и разрушение РНК) за счет

индукции синтеза протеинкиназы R (PKR) — неактивной в конститутивной форме и требующей сигнала для автофосфорилирования/активации. Одним из активаторов PKR является РНК вирусов. При взаимодействии PKR и двуцепочечной РНК происходит демаскировка каталитического домена PKR, который отвечает за автофосфорилирование [23]. Активированная PKR фосфорилирует фактор иницирования трансляции эукариотов (EIF2a), подавляя активность последнего, приводя к снижению трансляции белков в клетке и, тем самым, подавляя синтез вирусных белков.

Другими клеточными эффектами ИФН- $\gamma$  являются контроль клеточного цикла, роста и апоптоза макрофагов [24]. Также данный цитокин контролирует созревание моноцитов в эффекторные клетки, активацию нейтрофилов, усиление фагоцитоза, увеличение бактерицидной активности фагоцитирующих клеток (за счёт индукции синтеза iNOS и цитозольных компонентов НАДФ-Н-зависимой оксидазы фагоцитов), синтез макрофагального протеина NRAMP-1, который повышает резистентность макрофагов к внутриклеточным микроорганизмам [25]. Под влиянием ИФН- $\gamma$  усиливается экспрессия таких комплексов распознавания бактериальных липополисахаридов, как Толл-рецепторы (TLR)-2, TLR-4, CD14. Дефицит данных молекул влияет на функции макрофагов распознавать и захватывать патоген, тем самым нарушая процессы активации АПК и запуска иммунного ответа.

Помимо провоспалительных, ИФН- $\gamma$  обладает и рядом противовоспалительных эффектов:

- подавление миграции нейтрофилов;
- активация Т-регуляторных клеток;
- подавление дифференциации T<sub>H</sub>2 и T<sub>H</sub>17 клеток;
- активация апоптоза клеток эффекторов.

Нарушение функционирования системы ИФН- $\gamma$  может проявляться различными состояниями: от предрасположенности к тяжелым и атипичным инфекциям и онкогенезу до аутоиммунных заболеваний различных органов и систем (воспалительные заболевания кожи, ЖКТ, ЦНС, опорно-двигательного аппарата, органов внутренней секреции и др.) [26].

#### **Лабораторные методики на основе измерения продукции ИФН- $\gamma$ : Interferon Gamma Releasing Assay (IGRA)**

*Оценка функционального состояния иммунной системы*

Для исследования иммунной реакции принципиальное значение имеет выбор раздражителя. *In vivo* белковые молекулы внутриклеточного патогена подвергаются деградации соматическими

клетками с использованием «штатных» элементов клетки — протеасом. Протеасомы — органеллы, осуществляющие разрушение белковых молекул, выполнивших свою функцию. Они разрезают длинные белковые молекулы на короткие, имеющие длину 8–16 аминокислот. Пептиды, имеющие длину 8–10 а.к, связываются с молекулами основного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I. Комплексы пептид-МНС затем мигрируют на поверхность клетки, представляя иммунной системе информацию о белковом составе клетки. Профессиональные АПК поглощают патоген посредством фаго-, макропино- или эндоцитоза и затем в антиген-презентирующем компартменте клетки подвергают белковые молекулы деградации. Пептиды, продукты деградации, имеют несколько большую, по сравнению с получаемыми в соматических клетках, длину (15–24 а.к.). Последние связываются с молекулами МНС II и перемещаются на поверхность АПК. Комплексы МНС I в основном служат для представления антигена цитотоксическим лимфоцитам, в то время как МНС II — Т-хелперам. Существует феномен кросс-презентации, благодаря которому АПК способны представлять антиген цитотоксическим лимфоцитам, вызывая их активацию [27, 28].

Лимфоциты при первичном контакте с антигеном проходят фазу активации, результатом которой является появление антиген-специфичных клеток памяти, способных быстро реагировать при повторном контакте с антигеном и лежащих в основе специфического иммунитета. При повторном контакте с антигеном специфические T<sub>H</sub>1 и цитотоксические лимфоциты продуцируют ИФН- $\gamma$  *in vitro* [29].

Продукция ИФН- $\gamma$  может быть измерена на различных уровнях:

- концентрация внутриклеточной РНК ИФН- $\gamma$  (ПЦР в реальном времени, вестерн-блот, гибридизация *in situ*);
- внутриклеточная концентрация ИФН- $\gamma$  и подсчет клеток, секретирующих ИФН- $\gamma$  (проточная цитометрия);
- концентрация внеклеточного ИФН- $\gamma$  в супернатанте культуры клеток или цельной крови (ИФА, Cytometric Bead Array (CBA) и xMAP технологии);
- подсчет числа ИФН- $\gamma$  продуцирующих лимфоцитов (как пропорция антиген-специфических клеток в ELISpot).

Вне зависимости от метода детекции продукция ИФН- $\gamma$  используется как показатель напряженности специфического T<sub>H</sub>1 клеточного иммунного ответа. Методика может использоваться как для определения напряженности специфического иммунного ответа при условии знания молекулярной структуры антигена, так и для выявления

иммуногенных эпитопов (пептидов), которые в дальнейшем могут использоваться, например, при разработке вакцин.

#### Диагностика инфекционных заболеваний

Для диагностики туберкулеза (ТБ) относительно недавно разработаны и валидизированы диагностические системы, основанные на измерении продукции ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию «коктейлем» из двух белков М.Тб, относящихся к так называемому отличительному региону 1: Early secretory antigenic target-6 (EAST-6) и culture filtrate protein-10 (CFP-10) в культуре цельной крови и в реакции ELISpot. Повышенное содержание ИФН- $\gamma$  в супернатанте после инкубации говорит об активации инфекции. Большим числом исследований подтверждены преимущества метода над рутинной туберкулиновой пробой, проявляющиеся более высокой чувствительностью и специфичностью, способностью идентифицировать лиц с латентной инфекцией и высоким риском активации. Потенциально этот метод позволяет дифференцировать ТБ и поствакцинальный иммунитет (БЦЖ). Продолжаются исследования, направленные на уточнение эффективности метода в отдельных популяциях пациентов (дети, ВИЧ-инфицированные, лица из эндемичных регионов и др.) [30–34]. Tebruegge et al. с целью идентифицировать цитокиновый профиль, специфичный для туберкулеза, исследовали специфическую продукцию ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\gamma$  индуцируемый белок 10 (IP10), ФНО- $\alpha$ , антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1ра), ИЛ-2, ИЛ-13 и провоспалительный белок макрофагов  $1\beta$  (MIP- $1\beta$ ) в цельной крови в ответ на стимуляцию белками ESAT-6, CFP-10 и туберкулином у 149 детей, обследованных на активный и латентный туберкулез [35]. Продукция данных цитокинов была значительно повышена у пациентов как с активным, так и с латентным туберкулезом. Авторы установили, что измерение антиген-индуцированной продукции IP-10, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять тубинфицирование. При этом измерение продукции ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1ра и ИЛ-10 наилучшим образом позволяет дифференцировать латентный и активный туберкулез. Использование отношений ФНО- $\alpha$ /ИЛ-1ра и ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10 позволило правильно классифицировать 95,5% и 100% случаев соответственно. Авторы рекомендовали включить перечисленные биомаркеры в иммунодиагностические системы для повышения чувствительности последних.

Цитомегаловирусная (ЦМВ) инфекция также широко распространена и имеет преимущественно латентное течение, но представляет смертельную опасность для пациентов с иммуносупрессией: ВИЧ-инфицированные, новорожденные, пациен-

ты после пересадки органов и стволовых клеток. Для идентификации пациентов с высоким риском реактивации латентной ЦМВ инфекции разработаны и валидизированы диагностикумы на основе инкубации цельной крови и периферических лимфоцитов с различными иммуногенными пептидами ЦМВ. Сниженная продукция ИФН- $\gamma$  говорит о высоком риске реактивации инфекции. Тесты могут применяться в сочетании с определением вирусной нагрузки ЦМВ для оценки риска реактивации ЦМВ в трансплантологии с целью уточнения показаний для назначений противовирусных препаратов или коррекции иммуносупрессивной терапии [36, 37].

В работе Otani (2009) и позднее в работе Terada (2014) были продемонстрированы возможности использования вакцины Varicella Zoster в качестве антигена в культуре цельной крови (16–18 ч инкубации) для оценки напряженности специфического иммунитета против вируса Varicella Zoster (VZV) с целью определить перенесенную VZV-инфекцию в анамнезе, VZV-иммунный статус пациента, риск рецидива заболевания [38], пациентов, не ответивших на вакцинацию, а также пациентов высокого риска развития клинической VZV-инфекции [39].

Schoffelen et al. исследовали диагностические возможности методов, основанных на инкубации цельной крови с последующим измерением содержания ИФН- $\gamma$  в ИФА и стимулирования периферических лимфоцитов в ELISpot для диагностики инфекций, вызванных *Coxiella Burnetti* (Ку-лихорадка) [40]. В качестве антигенов использовались инактивированный формалином штамм «Хензерлинг» и инактивированный нагреванием штамм «Девятая миля» *S. Burnetti*. Было установлено, что оба диагностикума имеют высокую чувствительность в диагностике Ку-лихорадки, и их результаты значимо коррелируют между собой. Авторы рекомендовали проведение валидации методов на большей когорте пациентов.

В работе Woolley (2004) было установлено, что у ВИЧ-инфицированных пациентов, *Chlamidiae pneumoniae* может вызывать различные клинические проявления, в зависимости от преобладания клеточного или гуморального иммунного ответа. В частности, при недостаточности клеточного иммунного ответа или относительном преобладании Th2 ответа (который оценивался по содержанию в сыворотке крови специфических антител различных классов), патоген имеет склонность вызывать сердечно-сосудистую патологию у ВИЧ (+) пациентов [41]. Авторы использовали в качестве объекта цельную кровь, которую культивировали в присутствии антигена, представляющего собой элементарные тельца *S. pneumoniae*.

В серии работ Sundar et al. (2014) использовали различные модификации методики измерения

продукции ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию растворимым антигеном лейшмании [42]. В результате было установлено, что при использовании в качестве объекта периферических лимфоцитов достаточно сложно выявить продукцию ИФН- $\gamma$  в ответ на антиген-стимуляцию у пациентов с активным лейшманиозом. Однако при использовании в качестве объекта культуры цельной крови был выявлен значимый ответ в виде продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-10. Авторы заключили, что использование показателя продукции ИФН- $\gamma$  в качестве единственного маркера не эффективно, и рекомендовали использовать сочетание цитокинов и хемокинов, более полно отражающих специфический иммунный ответ.

Chapey et al. использовали методику IGRA для диагностики врожденного токсоплазмоза. В качестве объекта использовалась цельная кровь, которая культивировалась в течение 24 ч в присутствии антигена. В качестве стимула применялся фильтрат разрушенной несколькими циклами заморозки/разморозки с последующей обработкой ультразвуком токсоплазмы. При тестировании метода на взрослых пациентах (114 инфицированных и 58 не инфицированных) были установлены чувствительность и специфичность 96% и 91%, соответственно. В дальнейшем метод был использован для диагностики врожденного токсоплазмоза у детей. У 16 из 17 инфицированных детей была выявлена значительно более высокая продукция ИФН- $\gamma$  в цельной крови, чем у 45 не инфицированных (все дети были рождены от матерей, имевших сероконверсию к токсоплазме во время беременности). В результате были установлены 94% чувствительность и 98% специфичность метода у детей. Авторы заключили, что метод является простым и доступным для исключения врожденного токсоплазмоза [43].

В работе Liu et al. продемонстрирована возможность использования анализа профиля продукции цитокинов при стимуляции митогенами в клинической практике для оценки функции иммунной системы у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию. Установлено, что различные иммуносупрессоры имеют специфический, доза-зависимый профиль снижения реактивности лимфоцитов, что может быть использовано для оптимального выбора препарата и подбора дозировки [44].

#### *ELISpot*

IGRA с использованием цельной крови в качестве исследуемого объекта является относительно простым и эффективным методом, позволяющим исследовать напряженность T $\alpha$ 1 клеточного иммунного ответа в диагностике тех инфекционных заболеваний, в патогенезе которых послед-

ний играет значимую роль. Другим направлением использования IGRA является оценка иммуногенности пептидов, при тестировании возможности их использования для разработки новых вакцин. ELISpot (Enzyme linked immunosorbent spot, ELISpot) – методика, основанная на принципах иммуноферментного анализа, в отличие от последнего, использует в качестве исследуемого объекта не жидкие среды (сыворотка, плазма), а клетки крови. Принцип метода заключается в культивировании известного количества периферических лимфоцитов с антигеном на поверхности полупроницаемой мембраны, покрытой антителами к исследуемому цитокину (ИФН- $\gamma$ ). Клетки, при контакте с антигеном, вырабатывают ИФН- $\gamma$ , который связывается антителами. В дальнейшем мембрана обрабатывается биотинилированными антителами к тому же цитокину (ИФН- $\gamma$ ) и далее обрабатывается стрептавидин-связанным ферментом (пероксидаза или щелочная фосфатаза). В результате в тех участках мембраны, где находились клетки, вырабатывающие ИФН- $\gamma$ , образуются участки с ферментативной активностью, способные при нанесении субстрата трансформировать последний с окрашиванием мембраны. Подсчет числа окрашенных пятен (spots) позволяет количественно оценить содержание антиген-специфических клеток. ИФН- $\gamma$  ELISpot является наиболее часто используемым и валидизированным методом [45].

Основной областью применения ELISpot является скрининг антигенов с целью выявления иммуногенных эпитопов. Для этого создаются библиотеки перекрывающихся пептидов длиной 7–12 аминокислот, в совокупности охватывающие всю длину исследуемого белка. Те пептиды, которые распознаются антиген-специфическими клетками и вызывают выработку ИФН- $\gamma$ , идентифицируются как иммуногенные и используются в составе вакцин. В дальнейшем, при иммунизации (лабораторных животных или человека) выбранными пептидами возможно оценить эффективность вакцины, исследовав подобным образом клетки до и после иммунизации.

ELISpot широко используется (в сочетании с другими методами) при разработке ДНК-вакцин против Кори [46], ВИЧ [47, 48], гепатита С [49–51], лихорадки Эбола [52], а также при разработке клеточных вакцин против онкологических заболеваний [53, 54].

#### *Постановка IGRA*

Поскольку исследование антиген-индуцированной продукции цитокинов требует одновременной оценки способности лимфоцитов производить и секретировать цитокины, необходимо включение в постановку неспецифических стимуляторов в качестве положительного контроля.



В работе Reddy et al. произведен сравнительный кинетический анализ секреции цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ) в сочетании с исследованием кинетики экспрессии маркеров активации лимфоцитов в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА), форбол миристат ацетатом (ФМА), иономицином, стафилококковым энтеротоксином, антителами к CD3 — наиболее часто используемыми в качестве неспецифических стимуляторов агентами. Было установлено, что секреция ИЛ-2, ИЛ-4 и ИФН- $\gamma$  в ответ на все агенты ассоциирована с экспрессией маркеров активации лимфоцитов (CD25 и CD69). Пик продукции ИФН- $\gamma$  был установлен через 48 ч стимуляции ФГА, анти-CD3 и 48–72 ч при стимуляции ФМА + иономицин и стафилококковым энтеротоксином. Интересно, что добавление дексаметазона в культуру существенно угнетало продукцию всех исследуемых цитокинов [55]. Также в качестве положительного контроля может быть использован «коктейль» антител к CD3 и CD28, вызывающих TCR-опосредованную активацию Т-клеток и секрецию цитокинов.

Для уточнения оптимальной длительности инкубирования цельной крови с антигенами Lagrelius et al. исследовали внутри- и внеклеточное содержание 11 цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-13 и др.) при стимулировании культур цельной крови ФГА и антигенами ЦМВ. Было установлено, что, несмотря на нарастание внутриклеточной концентрации ИФН- $\gamma$ , наблюдавшееся в течение 2–3 дней стимуляции с последующим снижением, оптимальной для определения концентрации внеклеточного содержания ИФН- $\gamma$  является 7-дневная стимуляция, поскольку в течение данного периода наблюдалось нарастание концентрации ИФН- $\gamma$  в супернатанте. Феномен объясняется выраженной пролиферацией лимфоцитов в течение данного периода инкубации: количество лимфоцитов в культуре нарастало в 100–1000 раз на 7-й день по сравнению с началом культивирования и несмотря на снижение относительного содержания ИФН- $\gamma$  продуцирующих лимфоцитов на 3-й день, абсолютное число ИФН- $\gamma$  продуцирующих клеток оставалось тем же или даже возрастало в результате пролиферации [56].

Следует отметить вопросы, которые необходимо принимать во внимание при использовании методов IGRA:

- возможность неспецифической выработки интерферона гамма в результате активации НК, клетками, поврежденными токсическим действием стимула;
- высокая чувствительность к контаминации;
- чувствительность к выбору стимула;
- возможность сниженной продукции ИФН- $\gamma$  в результате развития феномена истощения специфического иммунного ответа;

- в отдельных случаях антиген-стимулированные клетки памяти могут подвергаться апоптозу;
- клетки памяти могут вырабатывать интерферон при изолированном (без антиген стимуляции) воздействии цитокинов (ИЛ-12 и -18);
- функциональное состояние тестируемых клеток, на которое оказывают влияние используемые протоколы выделения и сохранения клеток;
- особое внимание следует уделять интерпретации результатов — определению границ положительных/отрицательных значений;
- соотнесение положительных результатов с реальной картиной: антиген индуцированная продукция ИФН- $\gamma$  не означает наличие защитного иммунитета.

### Заключение

Детекция и исследование функциональной активности антиген-специфических Т-клеток представляет важную информацию о функционировании иммунной системы, наряду с определением специфических антител. Наиболее часто в лабораторной практике используются тесты на антиген-индуцированную продукцию интерферона-гамма. ИФН- $\gamma$  является уникальным цитокином, обеспечивающим взаимодействие множества клеточных систем посредством контроля транскрипции большого количества генов [57]. Однако для всестороннего, комплексного понимания функционирования специфического клеточного иммунного ответа у конкретного пациента целесообразно исследование антиген-индуцированной продукции множества биоактивных молекул, обеспечивающих регуляторные и эффекторные функции Т-клеток (например, ИЛ-2, ИЛ-10, перфорин, гранзим-Б и др.). Выбор конкретных маркеров активации Т-клеток зависит от цели исследования, однако современные методики позволяют совмещать детекцию нескольких молекул в одной постановке лабораторного теста, открывая новые возможности для исследований в области иммунологии. Использование IGRA с комплексе с другими лабораторными методами исследования необходимо для преодоления ограничений метода и получения результатов, достоверно отражающих состояние специфического иммунитета.

### Литература

1. Isaacs, A. Virus interference. I. The interferon / A. Isaacs and J. Lindenmann // Proc R Soc Lond B Biol Sci. — 1957. — Vol. 147, № 927. — P. 258–267.
2. Schneider, W.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses / W.M. Schneider, M.D. Chevillotte, C.M. Rice // Annu Rev Immunol. — 2014. — Vol. 32. — P. 513–545.
3. Wack, A. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons / A. Wack, E. Terczynska-Dyla, and R. Hartmann // Nat Immunol. — 2015. — Vol. 16, № 8. — P. 802–809.

4. Male, D.K. Immunology. United States: Elsevier/Saunders, c2013. 472 p.
5. Bao, Y. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells / Y. Bao [et al.] // *Cell Res.* — 2014. — Vol. 24, № 2. — P. 161–176.
6. Walter, M.R. Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. / M.R. Walter [et al.] // *Nature.* — 1995. — Vol. 376, № 6537. — P. 230–235.
7. Chan, C.J. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress / C.J. Chan, M.J. Smyth, L. Martinet // *Cell Death Differ.* — 2014. — Vol. 21, № 1. — P. 5–14.
8. Stetson, D.B. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function / D.B. Stetson [et al.] // *J Exp Med.* — 2003. — Vol. 198, № 7. — P. 1069–1076.
9. Brownlie, R.J. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded / R.J. Brownlie, R. Zamoyka. // *Nat Rev Immunol.* — 2013. — Vol. 13, № 4. — P. 257–269.
10. Hamza, T. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications / T. Hamza, J.B. Barnett, B. Li. // *Int J Mol Sci.* — 2010. — Vol. 11, № 3. — P. 789–806.
11. Akira, S. The role of IL-18 in innate immunity / S. Akira // *Curr Opin Immunol.* — 2000. — Vol. 12, № 1. — P. 59–63.
12. Caudell, E.G. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 / E.G. Caudell [et al.] // *J Immunol.* — 2002. — Vol. 168, № 12. — P. 6041–6046.
13. Schroder, K. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder [et al.] // *J Leukoc Biol.* — 2004. — Vol. 75, № 2. — P. 163–89.
14. Bach, E.A. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling / E.A. Bach, M. Aguet, R.D. Schreiber // *Annu Rev Immunol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 563–591.
15. Farrar, M.A. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor / M.A. Farrar, R.D. Schreiber // *Annu Rev Immunol.* — 1993. — Vol. 11. — P. 571–611.
16. Schindler, C. Cytokines and JAK-STAT signaling / C. Schindler // *Exp Cell Res.* — 1999. — Vol. 253, № 1. — P. 7–14.
17. Shtrichman, R. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity / R. Shtrichman, C.E. Samuel // *Curr Opin Microbiol.* — 2001. — Vol. 4, № 3. — P. 251–259.
18. Meraz, M.A. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway / M.A. Meraz [et al.] // *Cell.* — 1996. — Vol. 84, № 3. — P. 431–342.
19. Dorman, S.E. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies / S.E. Dorman [et al.] // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364, № 9451. — P. 2113–2121.
20. Gough, D.J. IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT? / D.J. Gough [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2008. — Vol. 19, № 5–6. — P. 383–394.
21. Groettrup, M. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? / M. Groettrup [et al.] // *Biochimie.* — 2001. — Vol. 83, № 3–4. — P. 367–372.
22. Mach, B. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease / B. Mach [et al.] // *Annu Rev Immunol.* — 1996. — Vol. 14. — P. 301–31.
23. Randall, R.E. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures / R.E. Randall, S. Goodbourn // *J Gen Virol.* — 2008. — Vol. 89, № 1. — P. 1–47.
24. Xaus, J. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis / J. Xaus [et al.] // *Immunobiology.* — 2001. — Vol. 204, № 5. — P. 543–550.
25. Cellier, M. Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia / M. Cellier [et al.] // *J Leukoc Biol.* — 1997. — Vol. 61, № 1. — P. 96–105.
26. Kelchtermans, H. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check / H. Kelchtermans, A. Billiau, P. Matthys // *Trends Immunol.* — 2008. — Vol. 29, № 10. — P. 479–486.
27. Vyas, J.M. The known unknowns of antigen processing and presentation / J.M. Vyas, A.G. Van der Veen, H.L. Ploegh // *Nat Rev Immunol.* — 2008. — Vol. 8, № 8. — P. 607–618.
28. Roche, P.A. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation / P.A. Roche, K. Furuta // *Nat Rev Immunol.* — 2015. — Vol. 15, № 4. — P. 203–216.
29. Schlingmann, T.R. Increased per cell IFN-gamma productivity indicates recent in vivo activation of T cells / T.R. Schlingmann [et al.] // *Cell Immunol.* — 2009. — Vol. 258, № 2. — P. 131–137.
30. Pai, M. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. / M. Pai, L.W. Riley, J.M. Colford, Jr. // *Lancet Infect Dis.* — 2004. — Vol. 4, № 12. — P. 761–776.
31. Karam, F. Sensitivity of IFN-gamma release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS progression / F. Karam [et al.] // *PLoS One.* — 2008. — Vol. 3, № 1. — P. e1441.
32. Mandalakas, A.M. High level of discordant IGRA results in HIV-infected adults and children / A.M. Mandalakas [et al.] // *Int J Tuberc Lung Dis.* — 2008. — Vol. 12, № 4. — P. 417–423.
33. Александрова, Е.Н. Новые лабораторные тесты, основанные на определении продукции интерферона гамма in vitro, в диагностике латентной туберкулезной инфекции у больных ревматическими заболеваниями при планировании и проведении лечения факторами некроза опухоли альфа / Е.Н. Александрова, М.Е. Диатропов, Е.А. Насонов // *Научно-практическая ревматология.* — 2010. — Т. 48, № 4. — С. 54–59.
34. Загдын, З.М. Исследование антиген-стимулированной продукции  $\gamma$ -интерферона ex vivo в периферической крови у больных активным туберкулезом легких / З.М. Загдын // *Журнал инфектологии.* — 2013. — Т. 5, № 2. — С. 22–31.
35. Tebruegge, M. Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis / M. Tebruegge [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* — 2015. — Vol. 192, № 4. — P. 485–99.
36. Abate, D. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients / D. Abate [et al.] // *J Clin Microbiol.* — 2013. — Vol. 51, № 8. — P. 2501–2507.
37. Giulieri, S. QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity / S. Giulieri, O. Manuel // *Expert Rev Mol Diagn.* — 2011. — Vol. 11, № 1. — P. 17–25.
38. Otani, N. Interferon-gamma release assay: a simple method for detection of varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity / N. Otani, K. Baba, T. Okuno. // *J Immunol Methods.* — 2009. — Vol. 351, № 1–2. — P. 71–74.
39. Terada, K. Varicella-zoster virus-specific, cell-mediated immunity with interferon-gamma release assay after vaccination of college students with no or intermediate IgG antibody response / K. Terada [et al.] // *J Med Virol.* — 2015. — Vol. 87, № 2. — P. 350–356.

40. Schoffelen, T. Diagnosis of *Coxiella burnetii* Infection: Comparison of a Whole Blood Interferon-Gamma Production Assay and a *Coxiella* ELISPOT / T. Schoffelen [et al.] // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9, № 8. — P. e103749.
41. Woolley, I.J. Chlamydia pneumoniae in HIV-infected patients and controls assessed by a novel whole blood interferon-gamma assay, serology and PCR / I.J. Woolley et al. // *Clin Microbiol Infect*. — 2004. — Vol. 10, № 9. — P. 820–825.
42. Singh, O.P. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises / O.P. Singh, S. Sundar // *Immunobiology*. — 2014. — Vol. 219, № 4. — P. 323–328.
43. Chapey, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. / E. Chapey [et al.] // *J Clin Microbiol*. — 2010. — Vol. 48, № 1. — P. 41–45.
44. Liu, Z. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood / Z. Liu [et al.] // *Cytokine*. — 2009. — Vol. 45, № 2. — P. 141–147.
45. Kalyuzhny, A.E. Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols. Totova, New Jersey: Humana Press, c2010. 261 p.
46. Максимов, Н.Л. Противокоревая ДНК-иммунизация в эксперименте: иммуногенность и безопасность / Н.Л. Максимов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2005. — Т. 50, № 1. — С. 4–8.
47. Streeck, H. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research / H. Streeck, N. Frahm, B.D. Walker // *Nat Protoc*. — 2009. — Vol. 4, № 4. — P. 461–469.
48. Даниленко, А.В. Иммуногенные свойства ДНК вакцины, кодирующей ВИЧ-1 полиэпитопный CTL иммуноген в составе аттенуированного штамма *Salmonella enteritidis* E23 / А.В. Даниленко [и др.] // *Сибирский медицинский журнал*. — 2009. — Т. 24, № 4–1. — С. 50–54.
49. Fournillier, A. A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. / A. Fournillier [et al.] // *J Infect Dis*. — 2013. — Vol. 208, № 6. — P. 1008–1019.
50. Масалова, О.В. Комбинированное применение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей белка NS3 вируса гепатита с, гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и блокатора регуляторных Т-клеток индуцирует эффективный иммунный ответ против вируса гепатита С / О.В. Масалова [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2012. — Т. 46, № 3. — С. 525–534.
51. Масалова, О.В. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С / О.В. Масалова [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2013. — Т. 58, № 2. — С. 21–28.
52. Zhu, F.C. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / F.C. Zhu [et al.] // *Lancet*. — 2015. — Vol. 385, № 9984. — P. 2272–2279.
53. Бармашов, А.Е. Оценка противоопухолевого иммунитета методом ELISpot у больных, получающих дендритноклеточную вакцину / А.Е. Бармашов [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2012. — Т. 11, № 3. — С. 47–51.
54. Бармашов, А.Е. Оценка специфического противоопухолевого иммунитета методом Elispot у больных, получающих вакцину "Мелавак" / А.Е. Бармашов [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2010. — Т. 9, № 3. — С. 37–40.
55. Reddy, M. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function / M. Reddy [et al.] // *J Immunol Methods*. — 2004. — Vol. 293, № 1–2. — P. 127–42.
56. Lagrelius, M. Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days / M. Lagrelius [et al.] // *Cytokine*. — 2006. — Vol. 33, № 3. — P. 156–165.
57. Billiau, A. Interferon-gamma: a historical perspective / A. Billiau, P. Matthys // *Cytokine Growth Factor Rev*. — 2009. — Vol. 20, № 2. — P. 97–113.

## References

- Isaacs, A. Virus interference. I. The interferon / A. Isaacs and J. Lindenmann // *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. — 1957. — Vol. 147, № 927. — P. 258–267.
- Schneider, W.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses / W.M. Schneider, M.D. Chevillotte, C.M. Rice // *Annu Rev Immunol*. — 2014. — Vol. 32. — P. 513–545.
- Wack, A. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons / A. Wack, E. Terczynska-Dyla, and R. Hartmann // *Nat Immunol*. — 2015. — Vol. 16, № 8. — P. 802–809.
- Male, D.K. Immunology. United States: Elsevier/Saunders, c2013. 472 p.
- Bao, Y. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells / Y. Bao [et al.] // *Cell Res*. — 2014. — Vol. 24, № 2. — P. 161–176.
- Walter, M.R. Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. / M.R. Walter [et al.] // *Nature*. — 1995. — Vol. 376, № 6537. — P. 230–235.
- Chan, C.J. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress / C.J. Chan, M.J. Smyth, L. Martinet // *Cell Death Differ*. — 2014. — Vol. 21, № 1. — P. 5–14.
- Stetson, D.B. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function / D.B. Stetson [et al.] // *J Exp Med*. — 2003. — Vol. 198, № 7. — P. 1069–1076.
- Brownlie, R.J. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded / R.J. Brownlie, R. Zamoyka. // *Nat Rev Immunol*. — 2013. — Vol. 13, № 4. — P. 257–269.
- Hamza, T. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications / T. Hamza, J.B. Barnett, B. Li. // *Int J Mol Sci*. — 2010. — Vol. 11, № 3. — P. 789–806.
- Akira, S. The role of IL-18 in innate immunity / S. Akira // *Curr Opin Immunol*. — 2000. — Vol. 12, № 1. — P. 59–63.
- Caudell, E.G. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 / E.G. Caudell [et al.] // *J Immunol*. — 2002. — Vol. 168, № 12. — P. 6041–6046.
- Schroder, K. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions / K. Schroder [et al.] // *J Leukoc Biol*. — 2004. — Vol. 75, № 2. — P. 163–89.
- Bach, E.A. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling / E.A. Bach, M. Aguet, R.D. Schreiber // *Annu Rev Immunol*. — 1997. — Vol. 15. — P. 563–591.
- Farrar, M.A. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor / M.A. Farrar, R.D. Schreiber // *Annu Rev Immunol*. — 1993. — Vol. 11. — P. 571–611.
- Schindler, C. Cytokines and JAK-STAT signaling / C. Schindler // *Exp Cell Res*. — 1999. — Vol. 253, № 1. — P. 7–14.
- Shtrichman, R. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity / R. Shtrichman, C.E. Samuel // *Curr Opin Microbiol*. — 2001. — Vol. 4, № 3. — P. 251–259.

18. Meraz, M.A. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiological specificity in the JAK-STAT signaling pathway / M.A. Meraz [et al.] // *Cell*. — 1996. — Vol. 84, № 3. — P. 431–342.
19. Dorman, S.E. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies / S.E. Dorman [et al.] // *Lancet*. — 2004. — Vol. 364, № 9451. — P. 2113–2121.
20. Gough, D.J. IFN $\gamma$  signaling—does it mean JAK-STAT? / D.J. Gough [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev*. — 2008. — Vol. 19, № 5–6. — P. 383–394.
21. Groettrup, M. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? / M. Groettrup [et al.] // *Biochimie*. — 2001. — Vol. 83, № 3–4. — P. 367–372.
22. Mach, B. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease / B. Mach [et al.] // *Annu Rev Immunol*. — 1996. — Vol. 14. — P. 301–31.
23. Randall, R.E. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures / R.E. Randall, S. Goodbourn // *J Gen Virol*. — 2008. — Vol. 89, № 1. — P. 1–47.
24. Xaus, J. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis / J. Xaus [et al.] // *Immunobiology*. — 2001. — Vol. 204, № 5. — P. 543–550.
25. Cellier, M. Expression of the human NRAM1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia / M. Cellier [et al.] // *J Leukoc Biol*. — 1997. — Vol. 61, № 1. — P. 96–105.
26. Kelchtermans, H. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check / H. Kelchtermans, A. Billiau, P. Matthys // *Trends Immunol*. — 2008. — Vol. 29, № 10. — P. 479–486.
27. Vyas, J.M. The known unknowns of antigen processing and presentation / J.M. Vyas, A.G. Van der Veen, H.L. Ploegh // *Nat Rev Immunol*. — 2008. — Vol. 8, № 8. — P. 607–618.
28. Roche, P.A. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation / P.A. Roche, K. Furuta // *Nat Rev Immunol*. — 2015. — Vol. 15, № 4. — P. 203–216.
29. Schlingmann, T.R. Increased per cell IFN- $\gamma$  productivity indicates recent in vivo activation of T cells / T.R. Schlingmann [et al.] // *Cell Immunol*. — 2009. — Vol. 258, № 2. — P. 131–137.
30. Pai, M. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. / M. Pai, L.W. Riley, J.M. Colford, Jr. // *Lancet Infect Dis*. — 2004. — Vol. 4, № 12. — P. 761–776.
31. Karam, F. Sensitivity of IFN- $\gamma$  release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS progression / F. Karam [et al.] // *PLoS One*. — 2008. — Vol. 3, № 1. — P. e1441.
32. Mandalakas, A.M. High level of discordant IGRA results in HIV-infected adults and children / A.M. Mandalakas [et al.] // *Int J Tuberc Lung Dis*. — 2008. — Vol. 12, № 4. — P. 417–423.
33. Aleksandrova, E.N. Novye laboratornye testy osnovannye na opredelenii produkcii interferona-gamma in-vitro v diagnostike latentnoj tuberkuleznoj infekcii u bolnyh revmaticheskimi zabollevaniami pri planirovanii i provedenii lecheniya faktorami nekroza opuholi alfa / E.N. Aleksandrova, M.E. Diatropov, E.L. Nasonov // *Nauchno-prkticheskaya revmatologiya*. — 2010. — T. 48, № 4. — S. 54–59.
34. Zagdyn, Z. Issledovanie antigen stimulirovannoj produkcii interferona ex vivo v perifericheskoy krovi u bolnyh aktivnym tuberkulezom legkih / Z. Zagdyn [i dr.] // *Jurnal Infektologii*. — 2013. — T. 5, № 2. — S. 22–31.
35. Tebruegge, M. Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis / M. Tebruegge [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. — 2015. — Vol. 192, № 4. — P. 485–99.
36. Abate, D. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients / D. Abate [et al.] // *J Clin Microbiol*. — 2013. — Vol. 51, № 8. — P. 2501–2507.
37. Giulieri, S. QuantiFERON(R)-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity / S. Giulieri, O. Manuel // *Expert Rev Mol Diagn*. — 2011. — Vol. 11, № 1. — P. 17–25.
38. Otani, N. Interferon-gamma release assay: a simple method for detection of varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity / N. Otani, K. Baba, T. Okuno. // *J Immunol Methods*. — 2009. — Vol. 351, № 1–2. — P. 71–74.
39. Terada, K. Varicella-zoster virus-specific, cell-mediated immunity with interferon-gamma release assay after vaccination of college students with no or intermediate IgG antibody response / K. Terada [et al.] // *J Med Virol*. — 2015. — Vol. 87, № 2. — P. 350–356.
40. Schoffelen, T. Diagnosis of *Coxiella burnetii* Infection: Comparison of a Whole Blood Interferon-Gamma Production Assay and a *Coxiella* ELISPOT / T. Schoffelen [et al.] // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9, № 8. — P. e103749.
41. Woolley, I.J. Chlamydia pneumoniae in HIV-infected patients and controls assessed by a novel whole blood interferon-gamma assay, serology and PCR / I.J. Woolley et al. // *Clin Microbiol Infect*. — 2004. — Vol. 10, № 9. — P. 820–825.
42. Singh, O.P. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises / O.P. Singh, S. Sundar // *Immunobiology*. — 2014. — Vol. 219, № 4. — P. 323–328.
43. Chapey, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. / E. Chapey [et al.] // *J Clin Microbiol*. — 2010. — Vol. 48, № 1. — P. 41–45.
44. Liu, Z. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood / Z. Liu [et al.] // *Cytokine*. — 2009. — Vol. 45, № 2. — P. 141–147.
45. Kalyuzhny, A.E. Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols. Totova, New Jersey: Humana Press, c2010. 261 p.
46. Maximov, N.L. Protivokorevaya dnk immunizaciya v ehksperimente: immunogennost i bezopasnost. / N.L. Maximov [i dr.] // *Voprosy virusologii*. — 2005. — T. 50, № 1. — S. 4–8.
47. Streeck, H. The role of IFN- $\gamma$  gamma Elispot assay in HIV vaccine research / H. Streeck, N. Frahm, B.D. Walker // *Nat Protoc*. — 2009. — Vol. 4, № 4. — P. 461–469.
48. Danilenko, A.V. Immunogennye svojstva dnk vakciny kodiruyushchej vich 1 poliehpitopnyj ctl immunogen v sostave attenuirovannogo shtamma salmonella enteritidis e23. / A.V. Danilenko [i dr.] // *Sibirskiy Medicinskiy Jurnal*. — 2009. — T. 24, № 4–1. — S. 50–54.
49. Fournillier, A. A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C viru. / A. Fournillier [et al.] // *J Infect Dis*. — 2013. — Vol. 208, № 6. — P. 1008–1019.
50. Masalova, O.V. Kombinirovannoe primenenie nukleotidnyh i aminokislotnyh posledovatel'nostej belka ns3 virusa gepatita C, gena granulocitarno makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora i blokatora regul'yatornyh T kletok inducirovannogo ehffektivnyj immunnyj otvet protiv virusa gepatita C / O.V. Masalova [i dr.] // *Molekul'naya Biologiya*. — 2012. — T. 46, № 3. — S. 525–534.
51. Masalova, O.V. Sravnitel'nyj analiz immunnogo otveta na dnk konstrukcii kodiruyushchie nestrukturnye belki virusa gepatita C / O.V. Masalova [i dr.] // *Problemy virusologii*. — 2013. — T. 58, № 2. — S. 21–28.
52. Zhu, F.C. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-

blind, placebo-controlled, phase 1 trial / F.C. Zhu [et al.] // Lancet. — 2015. — Vol. 385, № 9984. — P. 2272–2279.

53. Barmashov, A.E. Ocenka protivopuholevogo immuniteta metodom elispot u bolnyh poluchayushchih dendritnokletochnuyu vakcinu / A.E. Barmashov [i dr.] // Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal. — 2012. — T. 11, № 3. — P. 47–51.

54. Barmashov, A.E. Ocenka specificheskogo protivopuholevogo immuniteta metodom elispot u bolnyh poluchayushchih vakcinu melavak / A.E. Barmashov [i dr.] // Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal. — 2010. — T. 9, № 3. — S. 37–40.

55. Reddy, M. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function / M. Reddy [et al.] // J Immunol Methods. — 2004. — Vol. 293, № 1–2. — P. 127–42.

56. Lagrelius, M. Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days / M. Lagrelius [et al.] // Cytokine. — 2006. — Vol. 33, № 3. — P. 156–165.

57. Billiau, A. Interferon-gamma: a historical perspective / A. Billiau, P. Matthys // Cytokine Growth Factor Rev. — 2009. — Vol. 20, № 2. — P. 97–113.

---

*Авторский коллектив:*

*Луцкий Антон Александрович* — научный сотрудник отдела вирусных гепатитов и заболеваний печени Научно-исследовательского института детских инфекций, к.м.н.; тел.: 8(812)234-34-16, e-mail: a.lutskij@niidi.ru

*Жирков Антон Анатольевич* — младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института детских инфекций; тел.: 8(812)234-34-18, e-mail: ant-zhirkov@yandex.ru

*Лобзин Дмитрий Юрьевич* — врач-инфекционист клиники инфекционных болезней Военно-медицинской академии им С.М. Кирова; тел.: +7-999-200-24-45, e-mail: dlobzin89@mail.ru

*Рао Мартин* — PhD, исследователь-постдокторант отдела терапевтической иммунологии (TIM) департамента лабораторной медицины (LABMED) Каролинского университета; тел.: +46-7-621-84-653, e-mail: martin.rao@ki.se

*Алексеева Лидия Аркадьевна* — руководитель отдела клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института детских инфекций, д.м.н.; тел.: 8(812)234-34-18, e-mail: kldidi@mail.ru

*Мейерер Маркус Джозеф* — MD, PhD, FRCP (Лондон), профессор отдела терапевтической иммунологии (TIM) департамента лабораторной медицины (LABMED) и департамента микробиологии, опухолевой и клеточной биологии Каролинского университета, Центра трансплантации аллогенных стволовых клеток (CAST) Каролинского университетского госпиталя; тел.: +46-8-585-816-23, e-mail: markus.maeurer@ki.se

*Лобзин Юрий Владимирович* — директор Научно-исследовательского института детских инфекций, академик РАН, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)234-60-04, e-mail: niidi@niidi.ru