

**Profil odpowiedzi cytokinowej na antygeny mykobakterii
oraz ekspresja receptorów przekazywania sygnałów
w aktywnej gruźlicy i latentnym zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis***

Gruźlica nadal stanowi globalne zagrożenie zdrowia i życia ludzi. W 2012 roku odnotowano 8,6 mln przypadków gruźlicy, w tym 0,5 mln zachorowań u dzieci oraz 1,3 mln zgonów spowodowanych tą chorobą. Aż 450 000 nowych przypadków gruźlicy spowodowały wielolekooporne (MDR-TB, *multi-drug resistant tuberculosis*) szczepy *M. tuberculosis*, grupujące aż 9,6% szczepów ekstremalnie opornych (XDR-TB, *extensively drug-resistant tuberculosis*) oraz szczepów opornych na wszystkie leki przeciwpłatkowe (TDR, *totally drug-resistant tuberculosis*). W ten sposób gruźlica powróciła na listę chorób zakaźnych nieuleczalnych. Pomimo wieloletnich badań nad chorobotwórczością prątków *M. tuberculosis*, patologią gruźlicy, towarzyszące jej reakcje odpornościowe pozostają wciąż niezrozumiałe. Skutkuje to ograniczonymi możliwościami diagnozowania tej choroby, utrudnia opracowywanie skutecznych schematów terapeutycznych i monitorowania postępów leczenia oraz wyznaczania nowych sposobów swoistej profilaktyki. Odpowiadając na to wyzwanie, w niniejszej pracy wytyczono następujące naczelne cele badawcze: 1) określenie przydatności interferonowego testu QuantiFERON®-TB Gold In-Tube, opartego na pomiarze produkcji IFN- γ w odpowiedzi na specyficzne antygeny, ESAT-6, CFP-10, TB7.7, *Mycobacterium tuberculosis*, w diagnozowaniu aktywnej gruźlicy płuc oraz wykorzystanie tego testu do ustalenia częstości latentnych zakażeń *M. tuberculosis* wśród zdrowych osób pozostających i nie pozostających w bliskim kontakcie z chorymi na gruźlicę; 2) wyznaczenie parametrów odpornościowych gospodarza, które ulegają negatywnemu wpływowi prątków gruźlicy wymykających się w ten sposób spod nadzoru immunologicznego doprowadzając do wystąpienia aktywnej choroby, i które potencjalnie mogą być uznane za nowe biomarkery odpornościowe ułatwiające diagnozowanie aktywnej gruźlicy; 3) określenie parametrów odpornościowych umożliwiających unikanie zakażenia *M. tuberculosis* lub zachorowania na aktywną gruźlicę w warunkach długotrwałej wzmożonej ekspozycji na ten patogen. Te cele badawcze zostały zrealizowane poprzez oznaczenie produkcji IFN- γ , TNF- α i IL-10 w odpowiedzi na żywe prątki atenuowane *M. bovis* BCG i wirulentne *M. tuberculosis* H₃₇R_v, antygen ESAT-6 i oczyszczone białka tuberkulinowe PPD, w hodowlach pełnej

krwi oraz oznaczenie ekspresji receptorów przekazywania sygnałów, mCD14 i TLR2 na monocytach, markera CD3 na limfocytach T, integryny LFA-1 na monocytach i limfocytach T oraz surowiczego stężenia rozpuszczalnej formy receptora sCD14, w pięciu grupach badanych obejmujących 43 pacjentów z aktywną gruźlicą płuc, 46 chorych na ostre niemykobakteriowe zakażenia górnego układu oddechowego, 48 zdrowych długoletnich pracowników oddziałów gruźliczych, 41 zdrowych członków rodzin chorych na TB oraz 46 zdrowych ochotników nie wykazujących w wywiadzie kontaktów z chorymi na gruźlicę. Jako najważniejsze wyniki zrealizowanych badań należy uznać: 1) wykazanie przydatności testu interferonowego w wykrywaniu latentnych zakażeń *M. tuberculosis* oraz tylko pomocnej jego przydatności w szybkim diagnozowaniu aktywnej gruźlicy, nie zwalniającej z obowiązku wykonania klasycznego badania mikroskopowego i założenia hodowli, które pozostają nadal najbardziej wiarygodną metodą diagnostyczną w gruźlicy; 2) pokazanie, że raczej ilościowa niż jakościowa charakterystyka zespołu, a nie pojedynczej z badanych cytokin, IFN- γ , TNF- α , IL-10, produkowanych w odpowiedzi na rozpuszczalne i pełnokomórkowe antygeny mykobakterii obrazuje status odpornościowy pacjentów z aktywną gruźlicą; 3) wytypowanie nadekspresji błonowego receptora makrofagów mCD14 z współwystępującą nasiloną ekspresją integryny LFA-1 na monocytach krwi obwodowej, jako biomarkera odpornościowego aktywnej gruźlicy o potencjalnej wartości aplikacyjnej w szybkim diagnozowaniu gruźlicy, zwłaszcza pacjentów, u których nie udaje się wykazać obecności *M. tuberculosis* metodą bakterioskopii/hodowli lub molekularną oraz w monitorowaniu osób z latentnym zakażeniem *M. tuberculosis* zagrożonych rozwojem aktywnej gruźlicy; 4) wskazanie na występowanie we krwi obwodowej pacjentów z aktywną gruźlicą dominacji monocytów z silną ekspresją receptora TLR2^{high}, i potencjalny jego udziału w przekazywaniu negatywnego sygnału, którego skutkiem może być obserwowane u pacjentów zahamowanie produkcji IFN- γ w odpowiedzi na atenuowane prątki *M. bovis* BCG i spadkowa tendencja w zakresie częstości występowania nacieków limfocytarnych w płucach oraz skórnej nadwrażliwości późnej na tuberkulinę; 5) określenie intensywnej produkcji wszystkich trzech uwzględnionych w badaniach cytokin, IFN- γ , TNF- α , IL-10, w odpowiedzi na ESAT-6, specyficzny antygen *M. tuberculosis*, oraz nadekspresji integryny LFA-1 na monocytach i limfocytach T, jako parametrów odpornościowych

ważnych w zapobieganiu zakażeniu *M. tuberculosis* i zachorowaniu na gruźlicę, w warunkach długotrwałego kontaktu z pacjentami z aktywną gruźlicą.

**The profile of mycobacterial antigen induced cytokine responses
and the expression of signal transduction receptors
in the active tuberculosis and latent infection with *Mycobacterium tuberculosis***

Tuberculosis remains a major global health problem and ranks as the second leading cause of death from an infectious disease. In 2012, 8.6 million people including 0.5 million children developed tuberculosis and 1.3 million die from it. As many as 450 000 new tuberculosis cases caused MDR (*multi-drug-resistant tuberculosis*) *Mycobacterium tuberculosis* strains among them 9.6% were estimated XDR (*extensively drug-resistant*) and some TDR (*total drug-resistant*). In this way, tuberculosis returned to the list of incurable diseases. Associated tuberculosis immune responses are still unclear, despite many years of research of *M. tuberculosis* virulence and pathology of the disease. This limits the diagnosis of tuberculosis, hinders the development of effective therapeutic regimens and monitoring treatment progress, and new strategies for specific prevention. Having regard to the problems outlined, it was decided: 1) to evaluate the usefulness of QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube assay, that measures the IFN- γ released from T cells responding to specific antigens (ESAT-6, CFP-10, TB.7.7) of *M. tuberculosis*, for the diagnosis of tuberculosis in patients with active disease and to examine the frequency of the latent *M. tuberculosis* infections in healthy subjects who had or did not have a known contact with tuberculosis; 2) to identify the parameters of the host immune system that are weakened by *M. tuberculosis* and allow bacilli to avoid immune surveillance and lead to active disease, which could potentially be considered as biomarkers useful for the diagnosis of active tuberculosis; 3) to determine the parameters of host immunity that protect against infection with *M. tuberculosis* and against the development of active tuberculosis during long-term exposure to tuberculosis bacilli. Research objectives were achieved through a quantitative assessment of the production of IFN- γ , TNF- α and IL-10 in whole blood cultures stimulated with live attenuated *M. bovis* BCG or virulent *M. tuberculosis* H₃₇R_v bacilli, ESAT-6 antigen and purified tuberculin proteins PPD, examining of the surface expression of signal transduction receptors, mCD14 and TLR2 on monocytes, CD3 marker on T lymphocytes, LFA-1 integrin on monocytes and T lymphocytes and determining the concentration of soluble form sCD14 receptor in the sera, for five categories of volunteers. The study cohort comprises 43 patients with active pulmonary

tuberculosis, 46 patients with nonmycobacterial lung diseases, 48 healthy work contacts and 41 household contacts of patients with active tuberculosis and 46 healthy volunteers with no known tuberculosis contact. The most important results of completed study should be considered: 1) the *interferon-gamma release assay* may serve as a valuable screening test to identify individuals with latent *M. tuberculosis* infection and this test might help in rapid diagnosis of active tuberculosis, however the individual context of the patients should always be considered and the results must be confirmed by *M. tuberculosis* culture, which remains the most reliable method of diagnosing tuberculosis disease; 2) quantitative rather than a qualitative assessment of several cytokines, IFN- γ , TNF- α , IL-10, that are produced in the responses to soluble and whole bacilli antigens reflects the immune status of patients with active tuberculosis; 3) a significant increase in the expression of the membrane bound mCD14 and LFA-1 receptors in patients with active tuberculosis may be a biomarker potentially useful in the rapid diagnosis of patients from whom it is not possible to isolate *M. tuberculosis* and in monitoring patients with latent *M. tuberculosis* infection who are at risk of developing active disease; 4) a significant domination of TLR2^{high} monocytes in the peripheral blood of patients with active tuberculosis and the potential contribution of this receptor in the transmission of a negative signal may at least partly explain inhibited IFN- γ response to the attenuated *M. bovis* BCG and a downward trend in the frequency of lymphocytic infiltrates in the lung and positive skin reactivity to tuberculin, which was observed in patients with tuberculosis; 5) an intensive production of all three cytokines tested, IFN- γ , TNF- α , IL-10, in response to ESAT-6, the specific antigen of *M. tuberculosis*, and overexpression of LFA-1 on monocytes and T lymphocytes can be considered as the immune parameters important in preventing infection with *M. tuberculosis* and developing active tuberculosis under prolonged contact with the pathogen.