

УДК 616.24-002.5:578.233.22

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-149>

## Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких

Чурина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Попова А.В.<sup>1</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Патышева М.Р.<sup>2,3</sup>, Колобовникова Ю.В.<sup>1</sup>, Чумакова С.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук

Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – оценка экспрессии скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

**Материалы и методы.** Обследованы 64 пациента с туберкулезом легких (ТБ): 40 мужчин и 24 женщины, из которых 26 человек с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) и 38 – с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ). Из них было 42 пациента, выделяющих *Mycobacterium tuberculosis* (МВТ), чувствительные к основным противотуберкулезным средствам (ПТС), и 22 пациента, выделяющих МВТ, устойчивые к лекарственным средствам основного ряда противотуберкулезной терапии. Материалом исследования являлась венозная кровь.

Для выделения моноцитов из цельной крови с целью их трансформации в макрофаги использовали метод центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> с последующей иммуномагнитной сепарацией CD14<sup>+</sup> клеток. Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10 with gentamicin and phenol red с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) (5 нг/мл) в концентрации 1 × 10<sup>6</sup> клеток/мл со стимуляторами: интерлейкином (IL) 4 (10 нг/мл) и интерфероном (IFN) γ (100 нг/мл). Иммунофенотипирование макрофагов проводили с использованием моноклональных антител к CD163, CD204, CD206 на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX LX. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0. Полученные результаты анализировали статистическими методами.

**Результаты.** Переключение фенотипа макрофагов с провоспалительного M1 на противовоспалительный M2, установленное нами в ходе настоящего исследования, способствует хроническому течению туберкулеза легких, диссеминации и персистенции инфекции. Мы проанализировали особенности экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах показал значимое увеличение численности CD163, CD204 и CD206-позитивных клеток у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров.

**Заключение.** Исследование механизмов, лежащих в основе M1- или M2-активации макрофагов, необходимо для более глубокого понимания иммунопатогенеза туберкулезной инфекции и роли клеток врожденного иммунитета в защите организма от микобактерий. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах позволил нам прийти к заключению, что при туберкулезе легких, особенно у больных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* и при инфильтративной форме заболевания, реализуются механизмы регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, с поляризацией дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа, что, вероятно, является причиной формирования иммунодефицита, индуцированного возбудителем.

✉ Чурина Елена Георгиевна, Lena1236@yandex.ru

**Ключевые слова:** макрофаги, туберкулез легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ, скавенджер-рецепторы, IL-4, IFN $\gamma$ , CD163, CD204, CD206

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

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90018.

**Соответствие принципам этики.** От каждого обследованного было получено добровольное информированное согласие на проведение исследования. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5648 от 27.11.2017).

**Для цитирования:** Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Колобовникова Ю.В., Чумакова С.П. Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):140–149. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-140>.

## Expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis

Churina E.G.<sup>1,2</sup>, Popova A.V.<sup>1</sup>, Urazova O.I.<sup>1</sup>, Patysheva M.R.<sup>2,3</sup>, Kolobovnikova Ju.V.<sup>1</sup>, Chumakova S.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University

2 Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University

36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>3</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy Sciences 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

### ABSTRACT

**The aim** of the study was to evaluate the expression of scavenger receptors (CD163, CD204, CD206) on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis, depending on the clinical form of the disease and sensitivity of the pathogen to anti-tuberculosis drugs.

**Materials and methods.** 64 patients with pulmonary tuberculosis (TB) were examined: 26 patients with disseminated pulmonary tuberculosis (DTB) and 38 patients with infiltrative pulmonary tuberculosis (ITB). Of these, 42 patients secreted *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) sensitive to basic antituberculosis drugs (ATBD), and 22 patients secreted MBT resistant to first-line anti-TB drugs. Material for the study was venous blood.

To isolate monocytes from the whole blood in order to transform them into macrophages, Ficoll density gradient centrifugation with a density of 1.077 g / cm<sup>3</sup> was used followed by immunomagnetic separation of CD14<sup>+</sup> cells. Monocytes were cultured in the X-VIVO 10 medium with gentamicin and phenol red with the addition of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (5 ng / ml) at a concentration of 1×10<sup>6</sup> cells / ml with stimulators: interleukin (IL)-4 (10 ng / ml) and interferon (IFN)  $\gamma$  (100 ng / ml). Immunophenotyping of macrophages was performed using monoclonal antibodies to CD163, CD204, and CD206 on the Beckman Coulter CytoFLEX LX Flow Cytometer. The analysis of the obtained data was carried out using the CytExpert 2.0 software. The results were analyzed using statistical methods.

**Results.** Switching the phenotype of macrophages from the M1-like proinflammatory phenotype to M2-like anti-inflammatory one contributes to the chronic course of pulmonary TB, dissemination, and persistence of infection. In the present study, we analyzed the features of the expression of CD163, CD204, and CD206 scavenger receptors on macrophages in patients with pulmonary TB. An increase in the number of macrophages carrying markers of the M2 subpopulation (CD163, CD204, and CD206) on their surface was noted, regardless of the clinical form of pulmonary TB and drug resistance of *M. tuberculosis*.

**Conclusion.** Studying the mechanisms underlying M1 or M2 activation of macrophages is necessary for a deeper understanding of the immunopathogenesis of TB and the role of innate immunity cells in protecting the body from mycobacteria. The analysis of the expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages

allowed to conclude that, in pulmonary TB, especially in patients with drug resistant *M. tuberculosis* and infiltrative TB, regulatory mechanisms that suppress the activation of innate immunity are implemented together with polarization of macrophage differentiation towards the M2 phenotype. It may be the cause of immune deficiency induced by the pathogen.

**Keywords:** macrophages, pulmonary tuberculosis, innate immunity, immune response, scavenger receptors, IL-4, IFN $\gamma$ , CD163, CD204, CD206

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

**Source of financing.** The reported study was funded by the Council for Grants of the President of the Russian Federation for leading scientific schools (SS-2690.2018.7) and the RFBR grant, project number 19-315-90018.

**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. 5648 of 27.11.2017).

**For citation:** Churina E.G., Popova A.V., Urazova O.I., Patysheva M.R., Kolobovnikova Ju.V., Chumakova S.P. Expression of scavenger receptors CD163, CD204, and CD206 on macrophages in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):140–149. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-140-149>.

## ВВЕДЕНИЕ

Макрофаги играют важнейшую роль в защите организма от *Mycobacterium tuberculosis*. Они участвуют как во врожденных, так и в адаптивных иммунных реакциях, а также регулируют ремоделирование и процессы репарации поврежденных тканей [1, 2]. Макрофаги универсальны и пластичны, способны к быстрой конверсии функционального фенотипа в тканях [3–6]. Такая гетерогенность определяется свойством макрофагов реализовывать разные программы активации в ответ на различные стимулы: цитокиновые сигналы и сигналы, связанные с повреждением клетки или проникновением в организм паттернов патогенности.

В последнем Глобальном докладе ВОЗ о туберкулезе сообщается, что в 2018 г. снизилось число случаев смерти от туберкулеза – умерло 1,5 млн человек по сравнению с 1,6 млн в 2017 г. Тем не менее заболеваемость остается высокой: в 2018 г. около 10 млн человек в мире заболели туберкулезом [7]. Важная проблема – формирование у *M. tuberculosis* резистентности к противотуберкулезным средствам (ПТС). Вариант течения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, когда *M. tuberculosis* не реагирует ни на один из существующих антибиотиков, зарегистрирован в 117 странах мира [8].

Дисрегуляция иммунного ответа при развитии туберкулеза легких (ТБ) возникает уже на самых ранних его этапах, прежде всего, на стадии активации макрофагов и презентации антигена Т-лимфоцитам-хелперам. Макрофаги играют важную роль в механизмах успешной реализации иммунной защиты при проникновении компонентов *M. tuberculosis* в

слизистые оболочки дыхательных путей. М1-макрофаги запускают острое воспаление легких с быстрым включением механизмов врожденного иммунитета, воспалительного и цитотоксического Т-клеточных иммунных ответов, вызывая развитие острых деструктивных клинико-патогенетических форм – инфильтративного и диссеминированного ТБ [9]. В дальнейшем иммунологический контроль инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, зависит от направления дифференцировки макрофагов и эффективности воспалительного клеточного иммунного ответа, реализуемого CD4+ Т-лимфоцитами-хелперами первого типа (Th1) [10–12]. Переключение фенотипа макрофагов на противовоспалительный – М2, способствует хронизации и персистенции туберкулезной инфекции. Механизмы врожденных иммунных реакций при ТБ требуют более подробного рассмотрения, прежде всего, с помощью анализа рецепторного репертуара макрофагов. Наибольший интерес представляют скавенджер-рецепторы («мусорщики») моноцитов и (или) макрофагов, к которым относят маннозный рецептор CD206, скавенджер-рецептор типа А – SR-A (CD204), мембранный маркер CD163 [12, 13–16]. Открытыми остаются многие вопросы, связанные с пластичностью, поляризацией и активацией макрофагов при различных клинических формах ТБ, а также в зависимости от устойчивости или чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС.

Таким образом, целью работы явилась оценка экспрессии скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы обследованы 64 пациента (40 мужчин и 24 женщины) в возрасте 23–50 лет (средний возраст  $43,10 \pm 10,0$  лет) с впервые выявленным туберкулезом легких, диагностированным в Томском областном фтизиопульмонологическом медицинском центре. Диагноз устанавливался на основании анамнеза, клинической картины заболевания, а также результатов рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты. Все пациенты были обследованы до назначения специфической противотуберкулезной химиотерапии. Клиническая форма заболевания устанавливалась с использованием рентгенологического исследования легких. У пациентов в патологический процесс были вовлечены преимущественно оба легких: при ИТБ в легких фиксировались одна или несколько неоднородных теней инфильтрата (3–6 см в диаметре), при ДТБ – множественные очаги мелких и средних размеров с неоднородной структурой. У всех пациентов регистрировалось бактериовыделение (*Mtb*<sup>+</sup>). *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) определяли методом микроскопии окрашенного по Цилю – Нильсену мазка мокроты, а также методом люминесцентной микроскопии с применением аурамина. С помощью метода абсолютных концентраций и посева мокроты на питательные среды Левенштейна – Йенсена и Финн-2 выявляли видовую принадлежность возбудителя туберкулеза, а также чувствительность *Mtb* к противотуберкулезным средствам (ПТС).

Больные ТБ были разделены на две группы в зависимости от клинической формы заболевания: 26 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) и 38 пациентов с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ). У всех обследованных больных ТБ была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным ПТС. По данному критерию были выявлены 42 пациента, выделяющих *M. tuberculosis* (МВТ), чувствительные к основным ПТС, и 22 пациента, выделяющих МВТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). Критериями исключения больных ТБ из исследования являлись: 1) наличие онкологических заболеваний, сахарного диабета, аллергии и аутоиммунных заболеваний, вирусного гепатита и ВИЧ-инфекции; 2) лечение противотуберкулезными и иммуносупрессивными препаратами. Группу сравнения составили 30 здоровых доноров (20 мужчин и 10 женщин) в возрасте 23–50 лет (средний возраст  $41,31 \pm 7,47$  лет), не имеющих в анамнезе туберкулеза легких. От каждого обследованного было получено до-

бровольное информированное согласие на проведение исследования.

*Иммуномагнитная сепарация моноцитов крови.* Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких. Забор крови осуществлялся однократно, до начала курса противотуберкулезной химиотерапии, в момент разгара заболевания. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью последующей их трансформации в макрофаги применяли метод магнитной сепарации CD14<sup>+</sup> моноцитов (MACS MultiStand, Германия) согласно инструкции производителя Monocytes isolation kit, Miltenyi Biotec GmbH (Германия). Цельную венозную кровь в количестве 30 мл забирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (K<sub>3</sub>-ЭДТА). Кровь разводили 1 : 1 PBS (фосфатно-солевым буфером) и наслаивали на 15 мл фиколла с плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>. Образцы центрифугировали 30 мин при 0,016 g. Полученную мононуклеарную фракцию собирали и 2 раза отмывали PBS. После этого добавляли 5 мл PBS, перемешивали, затем подсчитывали количество мононуклеаров с помощью автоматического счетчика клеток Scepter 2,0 (Merck Millipore, Германия). Клеточную суспензию центрифугировали, снимали надосадок и из расчета количества клеток добавляли соответствующее количество MACS Separation Buffer (содержащий бычий сывороточный альбумин (BCA), ЭДТА и 0,09%-й азид) и CD14<sup>+</sup> магнитных частиц (Micro Beads, Германия), инкубировали 40 мин. Полученная суспензия подвергалась позитивной магнитной сепарации по протоколу компании (Miltenyi Biotec, Германия).

*Культивирование макрофагов in vitro.* Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10, With Gentamicin and Phenol Red (Lonza, Швейцария) в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов M-CSF (5 нг/мл; RnD Systems, США). Для дополнительной индукции клеток использовали рекомбинантные цитокины – IL-4 (10 нг/мл; PeproTech, США) (для M2-активации клеток) и IFN $\gamma$  (100 нг/мл; PeproTech, США) (для M1-активации клеток). Пробы без дополнительной стимуляции и с добавлением цитокинов M1- и M2-активации культивировали в течение 6 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 7,5% CO<sub>2</sub>.

*Имунофенотипирование макрофагов.* Фенотипирование макрофагов проводили на 6-е сут культивирования. Для сбора клеток плашку с культурой клеток помещали на лед и выдерживали 10 мин, затем с помощью клеточного скребка (Cell-scaper, США) собирали клетки. Для иммунофенотипирования макрофагов добавляли моноклональные антитела к CD163, CD204, CD206 (eBioscience, США). Из-



мерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США).

Для статистического анализа полученных результатов использовали программы SPSS Statistics 17.0 и Microsoft Excel. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха  $Me (Q_1-Q_3)$ . Для выполнения сравнительного анализа применяли непараметрический критерий Манна – Уитни с введением поправки Бенджамини – Хохберга. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах, *in vitro* трансформированных из CD14+ моноцитов крови, у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах показал значимое увеличение численности CD163- и CD206-позитивных клеток у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров (табл. 1, 2, рис. 1, 2).

Таблица 1

Экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %, $Me (Q_1-Q_3)$				
Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN $\gamma$
CD163	Здоровые доноры	12,43 (6,51–22,33)	4,11 (2,17–8,34) $p_3 = 0,011$	13,24 (7,41–16,71) $p_3 = 0,511$ $p_4 = 0,014$
	Больные ИТБ	44,23 (24,14–64,35) $p_1 = 0,012$	48,55 (27,31–59,54) $p_1 = 0,015$	26,70 (14,74–38,02) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,011$ $p_4 = 0,027$
	Больные ДТБ	40,81 (25,42–61,27) $p_1 = 0,010$	26,30 (17,11–41,72) $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,027$ $p_3 = 0,011$	27,83 (16,01–34,73) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,014$
CD204	Здоровые доноры	11,31 (6,75–20,14)	8,05 (4,11–17,76)	10,26 (7,11–19,33)
	Больные ИТБ	24,52 (14,27–34,36) $p_1 = 0,041$	40,83 (24,35–59,21) $p_1 = 0,017$ $p_3 = 0,037$	32,19 (16,14–50,36) $p_1 = 0,010$ $p_3 = 0,013$
	Больные ДТБ	9,56 (6,02–20,33) $p_2 = 0,014$	8,91 (5,63–21,30) $p_2 = 0,025$	19,62 (11,38–35,17) $p_1 = 0,017$ $p_2 = 0,011$ $p_3 = 0,045$ $p_4 = 0,037$
CD206	Здоровые доноры	17,16 (9,17–28,43)	13,4 (6,35–22,45)	4,41 (2,15–9,37) $p_3 = 0,017$ $p_4 = 0,035$
	Больные ИТБ	57,59 (28,12–68,18) $p_1 = 0,014$	58,27 (27,01–66,22) $p_1 = 0,037$	46,31 (26,45–61,27) $p_1 = 0,020$
	Больные ДТБ	33,01 (18,34–52,43) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,021$	29,37 (19,17–44,36) $p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,021$	23,44 (13,16–37,46) $p_1 = 0,037$ $p_2 = 0,014$ $p_3 = 0,012$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров –  $p_1$ ; у больных ИРТБ –  $p_2$ ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции –  $p_3$ ; – при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) –  $p_4$ .

После добавления в культуру клеток IL-4 (M2-активация) у больных ИТБ экспрессия CD163 существенно не изменялась в сравнении с ее величиной в отсутствие цитокиновой стимуляции в отличие от

таковой у лиц контрольной группы и больных ДТБ, у которых она снижалась. В группе здоровых доноров численность CD163-позитивных макрофагов при M2-активации была в 3,2 раза ниже относительно

количества клеток при M1-активации (при индукции клеток  $IFN\gamma$ ). У больных ДТБ экспрессия CD163 на макрофагах оказалась ниже, чем в отсутствие стимуляции, практически в 1,5 раза как при M1-, так и при M2-активации (см. табл. 1, см. рис. 1).

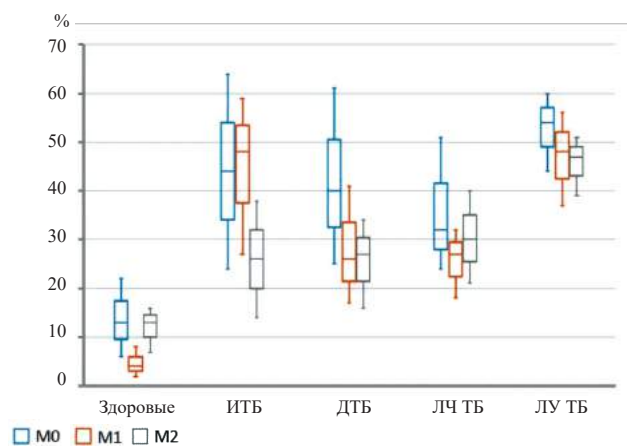


Рис. 1. Экспрессия скавенджер-рецептора CD163 на макрофагах у больных туберкулезом легких,  $Me (Q_1-Q_3)$ : ИТБ – инфильтративный туберкулез легких, ДТБ – диссеминированный туберкулез легких, ЛЧ ТБ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких, ЛУ ТБ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких, M0 – клеточная культура макрофагов без стимуляции цитокинами, M1 – клеточная культура макрофагов при стимуляции  $IFN\gamma$ , M2 – клеточная культура макрофагов при стимуляции IL-4 (здесь на рис. 2, 3)

Численность CD206-позитивных макрофагов при цитокиновой стимуляции у больных ИТБ существенно не изменялась в сравнении с базальным ее уровнем. У здоровых доноров и больных ДТБ экспрессия молекулы CD206 на макрофагах значительно снижалась в ответ на индукцию клеток  $IFN\gamma$  по сравнению с интактной культурой (см. табл. 1, рис. 2).

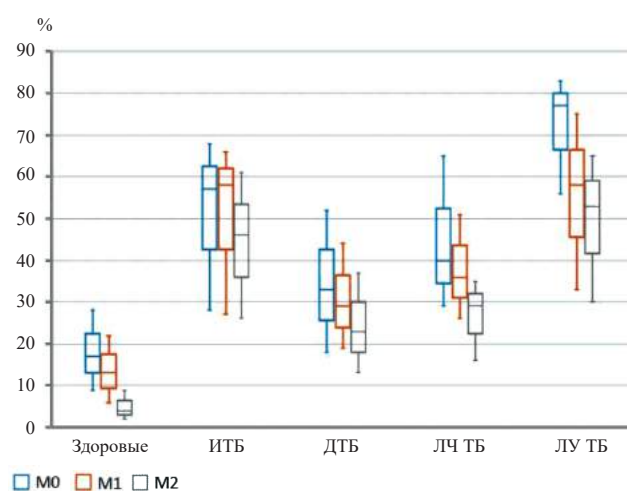


Рис. 2. Экспрессия скавенджер-рецептора CD206 на макрофагах у больных туберкулезом легких,  $Me (Q_1-Q_3)$

Индукцированная экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на макрофагах у больных ИТБ возрастала сравнительно с таковой без активации – более значительно после стимуляции культуры клеток IL-4, нежели  $IFN\gamma$ . В первом случае она возрастала в 5,1 раза по сравнению с ее величиной у здоровых доноров и в 4,6 раза – у больных ДТБ. У больных ДТБ, напротив, количество CD204-позитивных макрофагов в большей степени (более чем в 2 раза) увеличивалось в ответ на стимуляцию клеток  $IFN\gamma$  относительно такового в контрольной группе и после индукции клеток IL-4 (см. табл. 1, рис. 3).

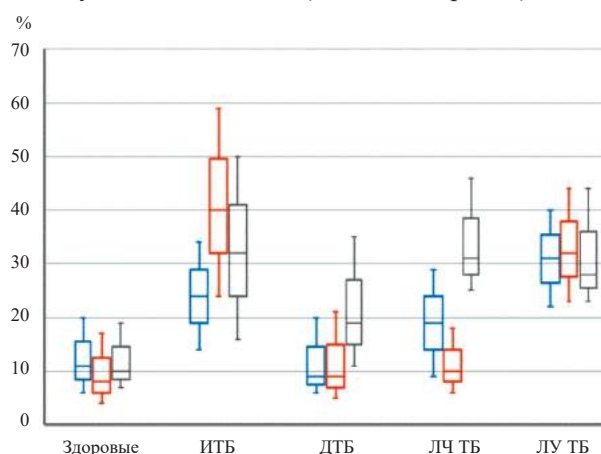


Рис. 3. Экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на макрофагах у больных туберкулезом легких,  $Me (Q_1-Q_3)$

### Экспрессия скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах, *in vitro* трансформированных из CD14+-моноцитов крови, у больных туберкулезом легких в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам

При анализе экспрессии маркеров M2-активации на макрофагах у больных ТБ в зависимости от чувствительности возбудителя к ПТС установлено, что наиболее высокая экспрессия молекулы CD163 на макрофагах отмечалась у больных ЛУ ТБ – базальная и при стимуляции клеток обоими цитокинами. У больных ЛЧ ТБ при индукции цитокинами она существенно не изменялась в сравнении с базальным уровнем экспрессии CD163, но (как и у больных ЛУ ТБ) была выше, чем у здоровых доноров (табл. 2, см. рис. 1).

Максимальное количество CD206-позитивных макрофагов при культивировании клеток без стимуляции и при индукции цитокинами также обнаруживалось у больных ЛУ ТБ – оно было выше, чем в контрольной группе и у больных ЛЧ ТБ. Однако при ЛУ ТБ как при M1-, так и при M2-активации цитокинами число CD206+ макрофагов было ниже, чем их количество в культуре клеток без стимуляции (см. табл. 2, рис. 3).

Таблица 2

Экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности <i>M. tuberculosis</i> к ПТС, %, Me (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> )				
Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN $\gamma$
CD163	Здоровые доноры	12,43 (6,51–22,33)	4,11 (2,17–8,34) $p_3 = 0,012$	13,24 (7,41–16,71) $p_4 = 0,015$
	Больные DS PTB	32,52 (24,45–51,23) $p_1 = 0,031$	27,25 (18,12–32,65) $p_1 = 0,012$	30,56 (21,65–40,28) $p_1 = 0,024$
	Больные DR PTB	54,23 (44,23–60,56) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,012$	48,77 (37,56–56,44) $p_1 = 0,024$ $p_2 = 0,043$	47,32 (39,11–51,22) $p_1 = 0,035$ $p_2 = 0,044$
CD204	Здоровые доноры	11,31 (6,75–20,14)	8,05 (4,11–17,76)	10,26 (7,11–19,33)
	Больные DS PTB	19,23 (9,54–29,11) $p_1 = 0,032$	10,26 (6,23–18,25)	31,33 (25,4–46,12) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,012$ $p_4 = 0,032$
	Больные DR PTB	31,23 (22,56–40,12) $p_1 = 0,034$ $p_2 = 0,011$	32,44 (23,56–44,36) $p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,023$	28,56 (23,54–44,2) $p_1 = 0,037$
CD206	Здоровые доноры	17,16 (9,17–28,43)	13,40 (6,35–22,45)	4,41 (2,15–9,37) $p_3 = 0,017$ $p_4 = 0,035$
	Больные DS PTB	40,13 (29,14–65,45) $p_1 = 0,012$	36,45 (26,17–51,45) $p_1 = 0,027$	29,03 (16,54–35,47) $p_1 = 0,015$ $p_3 = 0,014$
	Больные DR PTB	77,36 (56,45–83,12) $p_1 = 0,031$ $p_2 = 0,022$	58,36 (33,47–75,16) $p_1 = 0,010$ $p_2 = 0,025$ $p_3 = 0,013$	53,27 (30,45–65,44) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,042$ $p_3 = 0,014$

Примечание. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров –  $p_1$ ; у больных с DS PTB –  $p_2$ ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции –  $p_3$ ; – при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) –  $p_4$ .

Аналогичным образом на макрофагах при ЛУ ТБ регистрировалась наиболее высокая экспрессия CD204 – при культивировании клеток без стимуляции она была выше, чем в группе контроля и у больных ЛЧ ТБ. Вместе с тем при индукции клеток цитокинами она сохранялась на исходном уровне. Однако у больных ЛЧ ТБ после добавления в культуру макрофагов IFN $\gamma$  (при M1-активации клеток) было выявлено увеличение экспрессии рецептора CD204 – в 1,6 раза сравнительно с базальным ее уровнем и в 3,1 раза – с M2-активацией и группой контроля (см. табл. 2, рис. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая эффективность активации врожденного иммунитета при ТБ играет решающую роль в развитии и исходах заболевания. Нарушения индуктивной фазы иммунного ответа часто связаны с формированием толерантности к антигену уже на стадии его презентации. В этом случае вместо активации макрофагов и их дифференциации в направлении M1-клеток происходит формирование толерогенного и противовоспалительного фенотипа M2. Мобилизация моноцитов и поступление их в системный кровоток

из костного мозга всегда обусловлены усиленной антигенной нагрузкой, запросом на резидентные макрофаги иммунной системы при развитии воспаления в легких. Все больше исследований о гетерогенности популяции макрофагов указывают на то, что своевременное переключение фенотипа макрофагов с M1 на M2 и наоборот влияет на клинический исход туберкулезной инфекции [17–20].

Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов на макрофагах в целом показал повышение числа клеток, несущих на поверхности маркеры фенотипа M2 (CD163, CD204 и CD206), независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* (см. табл. 1, 2, рис. 1–3).

Наибольшее количество CD163-позитивных макрофагов мы зарегистрировали у больных ИТБ, особенно при M2-активации клеток (при M1-активации, напротив, число CD163+ макрофагов снижалось по сравнению с таковым в отсутствие цитокиновой стимуляции клеток). При ЛУ ТБ численность CD163-позитивных макрофагов была выше, чем при ЛЧ ТБ, как в интактной культуре клеток, так и при стимуляции IL-4 и IFN $\gamma$  (см. табл. 1, 2, рис. 1). Известно, что рецептор-«поглотитель гемоглобина» CD163

экспрессируется моноцитами и преимущественно макрофагами фенотипа M2 [21]. Поверхностный рецептор CD163 на макрофагах функционирует как рецептор врожденного иммунитета для распознавания паттернов патогенности бактерий, а его гиперэкспрессия может быть механизмом снижения острой тяжелой воспалительной реакции [22]. Логично, что макрофаги, экспрессирующие CD163, должны обладать регуляторным и восстановительным потенциалом для своевременного ограничения иммунного ответа, повреждающего ткани.

Оценивая экспрессию CD204 на макрофагах у больных ТБ, мы определили ее наибольшую интенсивность при ИТБ по сравнению с диссеминированной формой заболевания, при которой экспрессия маркера CD204 повышалась только в случае M1-активации клеток. Лекарственная чувствительность или устойчивость микобактерий не влияла на выраженность экспрессии молекулы CD204 – и в том, и в другом случае она повышалась (см. табл. 1, 2, рис. 2).

CD204 – акцепторный скавенджер-рецептор класса А (SR-A). В основном он экспрессируется на макрофагах, дендритных клетках и эпителиальных клетках дыхательных путей, является многофункциональным рецептором с широким лиганд-связывающим потенциалом [23, 24]. CD204 распознает модифицированные липидные белки, апоптотические клетки, патоген-ассоциированные молекулы [25]. Исследования CD204-нокаутных мышей показали, что экспрессия CD204 играет важную роль в поляризации дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа за счет ингибирования передачи сигналов через TLR [26].

Молекула CD206 представляет собой лектин С-типа или маннозный рецептор класса 1 (MR1), который обычно экспрессируется на тканевых макрофагах, дендритных клетках, эндотелиоцитах. Он связывает структуры с высоким содержанием маннозы на поверхности потенциально патогенных бактерий, вирусов и грибов [27]. CD206 играет важную роль в иммунном гомеостазе. Высокая экспрессия этого рецептора обнаруживается на клетках микроокружения злокачественных опухолей. Нарастание количества CD206-позитивных опухоль-ассоциированных макрофагов связано с плохим прогнозом заболевания и свидетельствует о развитии хронического воспаления в метастатических нишах [28]. У обследованных нами пациентов экспрессия маркера CD206 на макрофагах была наиболее выраженной при ИТБ и ЛУ ТБ, однако в последнем случае число CD206-позитивных клеток снижалось при индукции культуры как M1-, так и M2-стимуляторами (см. табл. 1, 2, рис. 3).

В литературе имеются данные о том, что поляризация макрофагов, участвующих в борьбе с *M. tuberculosis*, неоднородна [4, 29]. Изучены различные механизмы, с помощью которых антиген преобразовывает макрофаги из M1-клеток в M2-клетки с их иммунорегуляторной активностью, тем самым создавая себе благоприятную среду для существования. В исследовании, проведенном на модели стафилококковой легочной инфекции у мышей, было отмечено, что *Staphylococcus aureus* индуцирует сигнальный путь Akt1 (Akt1 – protein kinase B), сдвигая поляризацию макрофагов с антимикробного фенотипа M1 в направлении функционально инертного типа M0 [30]. В другой работе показано, что *M. tuberculosis* секретируют факторы вирулентности LAM (липоарабиноманнан) и ESAT-6, которые ингибируют активацию M1-макрофагов посредством блокирования созревания фаголизосом и активации of nuclear factor κB (NF-κB) [17].

Таким образом, высокая экспрессия скавенджер-рецепторов на макрофагах при туберкулезе легких может быть связана с предрасположенностью больных к реализации, в первую очередь, регенераторных и противовоспалительных функций макрофагов и их дифференциации по пути M2-фенотипа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов, лежащих в основе M1- или M2-активации макрофагов, необходимо для более глубокого понимания иммунопатогенеза туберкулезной инфекции и роли клеток врожденного иммунитета в защите организма от микобактерий. Анализ экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204 и CD206 на макрофагах позволил нам прийти к заключению, что при туберкулезе легких, особенно у больных с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* и при инфильтративной форме заболевания, реализуются механизмы регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, с поляризацией дифференцировки макрофагов в направлении M2-фенотипа, что, вероятно, является причиной формирования иммунодефицита, индуцированного возбудителем.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Davies L.C., Taylor P.R. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*. 2015;144(4):541–548. DOI: 10.1111/imm.12451.
2. Mills C.D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 2012;32(6):463–488. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10.
3. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* 2019;106(2):275–282. DOI: 10.1002/JLB.MR0318-095RR.



4. Guilliams M., Svedberg F.R. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Review Nat. Immunol.* 2021;22(2):118–127. DOI: 10.1038/s41590-020-00849-2.
5. Cheah F.C., Presicce P., Tan T.L., Carey B.C., Kallapur S.G. Studying the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on fetal lung macrophages during the perinatal period using the mouse model. *Front. Pediatr.* 2021;9:614209. DOI: 10.3389/fped.2021.614209.
6. Global tuberculosis report. Health Organization Report. Geneva, 2019. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-report-2019>.
7. Global tuberculosis report World Health Organization Report. Geneva, 2018. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>.
8. Leopold Wager C.M., Arnett E., Schlesinger L.S. Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007585. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007585.
9. Santos J.H.A., Bühner-Sékula S., Melo G.C., Cordeiro-Santos M., Pimentel J.P.D., Gomes-Silva A. et al. *Ascaris lumbricoides* coinfection reduces tissue damage by decreasing IL-6 levels without altering clinical evolution of pulmonary tuberculosis or Th1/Th2/Th17 cytokine profile. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019;52:e20190315. DOI: 10.1590/0037-8682-0315-2019.
10. Zhai W., Wu F., Zhang Y., Fu Y., Liu Z. The Immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(2):340. DOI: 10.3390/ijms20020340.
11. Shim D., Kim H., Shin S.J. *Mycobacterium tuberculosis* infection-driven foamy macrophages and their implications in tuberculosis control as targets for host-directed therapy. *Front. Immunol.* 2020;11:910. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00910.
12. Maler M.D., Nielsen P.J., Stichling N., Cohen I., Ruzsics Z., Wood C. et al. Role of the scavenger receptor MARCO in mediating adenovirus infection and subsequent innate responses of macrophages. *mBio.* 2017;8(4):e00670–17. DOI: 10.1128/mBio.00670-17.
13. Gayer F.A., Reichardt S.D., Bohnenberger H., Engelke M., Reichardt H.M. Characterization of testicular macrophage subpopulations in mice. *Immunol. Lett.* 2022;243:44–52. DOI: 10.1016/j.imlet.2022.02.003.
14. Prabhu Das M.R., Baldwin C.L., Bollyky P.L., Bowdish D.M.E., Drickamer K., Febbraio M. et al. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J. Immunol.* 2017;198(10):3775–3789. DOI: 10.4049/jimmunol.1700373.
15. Wong C.K., Smith C.A., Sakamoto K., Kaminski N., Koff J.L., Goldstein D.R. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice. *J. Immunol.* 2017;199(3):1060–1068. DOI: 10.4049/jimmunol.1700397.
16. Wolfsberger J., Sakil H.A.M., Zhou L., van Bree N., Baldissari E., Ferreira S.S. et al. TAp73 represses NF- $\kappa$ B-mediated recruitment of tumor-associated macrophages in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2021;118(10):e2017089118. DOI: 10.1073/pnas.2017089118.17.
17. Pisu D., Huang L., Narang V., Theriault M., Lê-Bury G., Lee B. et al. Single cell analysis of M. tuberculosis phenotype and macrophage lineages in the infected lung. *J. Exp. Med.* 2021;218(9):e20210615. DOI: 10.1084/jem.20210615.
18. Rocha D.M.G.C., Magalhães C., Cá B., Ramos A., Carvalho T., Comas I. et al. Heterogeneous streptomycin resistance level among mycobacterium tuberculosis strains from the same transmission cluster. *Front. Microbiol.* 2021;12:659545. DOI:10.3389/fmicb.2021.659545.
19. Marino S., Cilfone N.A., Mattila J.T., Linderman J.J., Flynn J.L., Kirschner D.E. Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect. Immun.* 2015;83(1):324–338. DOI: 10.1128/IAI.02494-14.
20. Weaver L.K., Hintz-Goldstein K.A., Pioli P.A., Wardwell K., Qureshi N., Vogel S.N. et al. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2006;80(1):26–35. DOI: 10.1189/jlb.1205756.
21. Fabrick B.O., van Bruggen R., Deng D.M., Ligtenberg A.J.M., Nazmi K., Schornagel K. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009;113(4):887–892. DOI: 10.1182/blood-2008-07-167064.
22. Dieudonné A., Torres D., Blanchard S., Taront S., Jeannin P., Delneste Y. et al. Scavenger receptors in human airway epithelial cells: role in response to double-stranded RNA. *PLoS One.* 2012;7(8):e41952. DOI: 10.1371/journal.pone.0041952.
23. Canton J., Neculai D., Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(9):621–634. DOI: 10.1038/nri3515.
24. Kubota K., Moriyama M., Furukawa S., Rafiul H.A.S.M., Maruse Y., Jinno T. et al. CD163<sup>+</sup>CD204<sup>+</sup> tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1755. DOI: 10.1038/s41598-017-01661-z.
25. Komohara Y., Takemura K., Lei X.F., Sakashita N., Harada M., Suzuki H. et al. Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to upregulation of nitric oxide and interferon-gamma production by tumor-associated macrophages. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2160–2166. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01296-x.
26. Barreto-Bergter E., Figueiredo R.T. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014;4:145. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00145.
27. Azad A.K., Rajaram M.V., Schlesinger L.S. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *J. Cytol. Mol. Biol.* 2014;1(1):1000003. DOI: 10.13188/2325-4653.1000003.
28. Kaku Y., Imaoka H., Morimatsu Y., Komohara Y., Ohnishi K., Oda H. et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014;9(1):e87400. DOI: 10.1371/journal.pone.0087400.
29. Weiss G., Schaible U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 2015;264(1):182–203. DOI: 10.1111/imr.12266.
30. Xu F., Kang Y., Zhang H., Piao Z., Yin H., Diao R. et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of Staphylococcus aureus pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 2013;208(3):528–538. DOI: 10.1093/infdis/jit177.

## Вклад авторов

Чурина Е.Г. – разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи. Попова А.В. – пробоподготовка биоматериала, выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, написание и оформление текста рукописи. Уразова О.И. – материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание, оформление и перевод текста рукописи. Патышева М.Р. – выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, консультативная помощь при разработке дизайна исследования. Колобовникова Ю.В. – взаимодействие с пациентами, консультирование соавторов по вопросам фтизиатрии и пульмонологии. Чумакова С.П. – взаимодействие с пациентами, обеспечение забора биоматериала.

## Информация об авторах

**Чурина Елена Георгиевна** – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ; профессор кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии, НИ ТГУ, г. Томск, Lena1236@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8509-9921>

**Попова Анжелика Владимировна** – аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, anjelika.sitnikova@yandex.ru

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

**Патышева Марина Ринатовна** – мл. науч. сотрудник, лаборатория биологии опухолевой прогрессии, НИИ онкологии Томского НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск, marinapatysh@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5758-7330>

**Колобовникова Юлия Владимировна** – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, kolobovnikova.julia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7156-2471>

**Чумакова Светлана Петровна** – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии, СибГМУ, г. Томск, chumakova\_s@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

(✉) **Чурина Елена Георгиевна**, Lena1236@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2022;  
одобрена после рецензирования 06.05.2022;  
принята к публикации 09.06.2022