

На правах рукописи

ПОПОВА АНЖЕЛИКА ВЛАДИМИРОВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФЕНОТИП, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Чурина

Елена Георгиевна

доктор медицинских наук, профессор,

Уразова

член-корреспондент РАН

Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,

Савченко

руководитель лаборатории

Андрей Анатольевич

клеточно-молекулярной физиологии и патологии

НИИ медицинских проблем Севера –

обособленного подразделения

ФИЦ КНЦ СО РАН

доктор медицинских наук, доцент,

Голубинская

ведущий научный сотрудник ЦНИЛ

Елена Петровна

Медицинской академии им. С.И. Георгиевского

Крымского федерального университета

им. В.И. Вернадского

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ, г. Новосибирск)

Защита состоится «__» ____ 2021 года в __. __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Макрофаги – главные эффекторные клетки в защите организма от патогенов. Они играют ключевую роль в организации как врожденных, так и адаптивных иммунных реакций, а также регулируют ремоделирование и процессы репарации поврежденных тканей [Weiss G., Schaible U.E., 2015; Davies L.C., Taylor P.R., 2015]. Макрофаги универсальны и пластичны, способны к быстрой конверсии функционального фенотипа в тканях [Mills C.D., 2015; Khan A. et al., 2019; Wynn T.A., Vannella K.M., 2016]. 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. При классической активации макрофаги поддерживают течение острого воспалительного Т-клеточного иммунного ответа, одновременно осуществляя эффекторную функцию (M1-активация). При альтернативной активации макрофаги приобретают толерогенный фенотип, в результате происходит их функциональная перестройка, и они начинают выполнять супрессорную функцию, способствуя фиброгенезу, пролиферативным процессам и регенерации тканей (M2-активация) [Swirski F.K., Nahrendorf M., 2013; Possamai L.A. et al., 2014].

Несмотря на разработанный ВОЗ еще в 2006 году глобальный план «Остановить туберкулез», который был направлен на исчезновение заболевания к 2015 году, цели не были достигнуты. Заболеваемость остается высокой: в 2018 году около 10 миллионов человек в мире заболели туберкулезом [World Health Organization, 2019]. Другая проблема – формирование у *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) резистентности к противотуберкулезным средствам (ПТС). Вариант течения туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, когда *Mtb* не реагирует ни на один из существующих антибиотиков, зарегистрирован в 117 странах мира [World Health Organization, 2018].

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-хелперам. Макрофаги играют важную роль в механизмах успешной реализации иммунной защиты при проникновении *Mtb* в слизистые оболочки дыхательных путей. Они запускают острое воспаление с быстрым включением механизмов врожденного иммунитета, воспалительного и цитотоксического Т-клеточных иммунных ответов [Wager L., 2019]. В дальнейшем иммунологический контроль инфекции, вызванной *Mtb*, зависит от направления дифференцировки макрофагов и эффективности воспалительного клеточного иммунного ответа, реализуемого CD4⁺ Т-лимфоцитами-хелперами (Th) первого типа – Th1 [Santos J.H.A. et al., 2019]. Переключение фенотипа макрофагов на противовоспалительный – M2, способствует хронизации и персистенции туберкулезной инфекции. Возможно, поляризация фенотипа предшественников макрофагов – моноцитов происходит еще в кровотоке под влиянием комплекса цитокинов и ростовых факторов [Zhai W. et al., 2019; Shim D. et al., 2020]. Механизмы врожденных иммунных реакций при ТБ требуют более подробного рассмотрения с помощью анализа рецепторного репертуара макрофагов. Наибольший интерес представляют скавенджер-рецепторы

(«мусорщики») моноцитов/макрофагов, к которым относят маннозный рецептор CD206, скавенджер-рецептор типа А – SR-A (CD204), мембранный маркер CD163 [Maler M.D. et al., 2017; Mercy R., et al., 2017; Wong C.K. et al., 2017; Shim D. et al., 2020]. В структуре цитокинов, секретируемых M1-макрофагами, наиболее значимыми являются провоспалительные медиаторы интерлейкин (IL)-1 β и IL-6, вызывающие развитие острого воспаления. IL-1 β играет решающую роль в успешном иммунном ответе организма на *Mtb* при клинической манифестации ТБ, способствует дифференцировке наивных Т-хелперов в направлении Th1/Th17 и активирует биосинтез белков острой фазы воспаления в печени [Barber D.L. et al., 2010; Zhu H. et al., 2016; Gleeson L.E. et al., 2016]. Известно, что избыточная секреция IL-6 макрофагами при остро прогрессирующем деструктивном ТБ может приводить к развитию «цитокинового шторма» [Mihara M. et al., 2012; Grupp S.A. et al., 2013].

Цитокиновый профиль M2-макрофагов представлен преимущественно IL-10 и трансформирующим фактором роста (TGF)- β . IL-10 – плеiotропный цитокин, который оказывает как противовоспалительное, так и стимулирующее действие на различные иммунокомпетентные клетки и способствует поддержанию иммунного гомеостаза [Kumar R. et al., 2019]. TGF- β играет важную роль в контроле над интенсивностью иммунного ответа, пролиферацией клеток, репаративными процессами, ангио- и фиброгенезом [Morikawa M. et al., 2016; Haque S., Morris J.C., 2017; Zhang J. et al., 2019]. Направление дифференцировки макрофагов, вероятно, определяется не только цитокиновым микроокружением и особенностями антигена, но и системным цитокиновым статусом организма. Открытыми остаются вопросы, связанные с механизмами, обеспечивающими пластичность, поляризацию и активацию макрофагов при различных клинических формах ТБ, а также в зависимости от устойчивости/чувствительности *Mtb* к ПТС.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, а также высокую социальную значимость ТБ, исследование функционального фенотипа макрофагов, механизмов их активации и дифференцировки *in vitro* у больных ТБ является актуальным и позволит в дальнейшем разработать методологические подходы к их функциональному перепрограммированию под влиянием широкого спектра молекулярно-клеточных факторов.

Степень разработанности темы. Наиболее важным представляется выявление биологических маркеров и факторов, обуславливающих пластичность макрофагов. Установлена роль скавенджер-рецепторов в регуляции адаптивного иммунного ответа путем направления дифференцировки Т-хелперов после распознавания ими антигенного пептида. Наиболее важным представляется выявление биологических маркеров и факторов, обуславливающих пластичность макрофагов. Установлена роль скавенджер-рецепторов в регуляции реакций адаптивного иммунитета посредством поляризации дифференцировки Т-лимфоцитов-хелперов после распознавания ими антигенного пептида. Так, на экспериментальной модели туберкулезной инфекции у мышей показано, что экспрессия паттерн-распознающего рецептора (PRR) класса А (CD204) может регулироваться патогеном и подавлять транслокацию в ядро IRF5 (интерферон-регулирующего фактора 5), что приводит к изменению фенотипа макрофагов с M1 на M2 и переключению адаптивного ответа Т-хелперов (Th1 \rightarrow Th2) [Zhipeng Xu et al., 2017]. В эксперименте на клеточной линии яичника китайского хомячка

доказана возможность трансформации одного фенотипа макрофагов в другой. Было показано, что для трансформации клеток M1 в M2 требуется стимуляция макрофагов IL-4 и дексаметазоном [Kzhyshkowska J. et al., 2006]. Обнаружено, что *Mtb* индуцируют секрецию IL-10 через рецептор CD209 на дендритных клетках и макрофагах, ограничивая тем самым провоспалительный ответ при ТБ [Hajishengallis G., Lambris J., 2011]. Изучены свойства циркулирующих моноцитов у больных ТБ и обнаружена дисфункция клеток, которая проявлялась низкой экспрессией молекул CD86 и HLA-DR на фоне двукратного увеличения экспрессии маркеров CD14 и CD16 [Sakhno L.V. et al., 2015].

Показано, что при *Mtb*-инфекции M1-макрофаги вследствие секреции IL-10 подвергаются конверсии в клетки с M2-фенотипом. Ряд других медиаторов (IL-4, IL-13, TGF- β , факторы роста гранулоцитов и макрофагов (M-CSF и GM-CSF)) направляют дифференциацию макрофагов по альтернативному пути [Martinez F.O., 2014; Piazzon M.C. et al., 2016]. Поляризация макрофагов в направлении M1, напротив, происходит при стимуляции клеток провоспалительными медиаторами – интерфероном (IFN) γ , фактором некроза опухоли (TNF) α и бактериальным липополисахаридом (LPS) [Cassetta L. et al., 2014].

Цель исследования: установить особенности функционального фенотипа, молекулярные механизмы дифференцировки и активации макрофагов, *in vitro* трансформированных из CD14⁺-моноцитов крови, у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию молекул активации, костимуляции и сквенджер-рецепторов (HLA-DR, CD80, CD163, CD204) на CD14⁺-моноцитах у больных инфильтративными и диссеминированным, лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.
2. Оценить влияние дисбаланса *in vitro* секреции цитокинов (IL-2, IL-10, TGF- β) мононуклеарными лейкоцитами крови на направление дифференцировки моноцитов крови в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.
3. Охарактеризовать иммунофенотип макрофагов, трансформированных *in vitro* из CD14-позитивных моноцитов крови: определить экспрессию маркеров M1-макрофагов (CD80, CD86, HLA-DR) и M2-макрофагов (CD163, CD204, CD206) у больных инфильтративными и диссеминированным, лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.
4. Оценить особенности *in vitro* секреции провоспалительных (IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-10, TGF- β) цитокинов в клеточной культуре макрофагов при M1- и M2-активации клеток у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя.
5. Установить механизмы поляризации функционального фенотипа макрофагов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

Научная новизна. Выполнено комплексное исследование функционального фенотипа моноцитов и макрофагов *in vitro* у больных

туберкулезом легких. Впервые проведена оценка экспрессии маркеров активации и скавенджер-рецепторов на макрофагах в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам (ПТС). Установлены особенности иммунофенотипа макрофагов при различных клинических формах и вариантах течения ТБ. Показано, что при ТБ наибольшее количество моноцитов и макрофагов, экспрессирующих скавенджер-рецепторы CD163 и CD204, определяется у больных диссеминированным и лекарственно-устойчивым ТБ. При этом данные изменения сопровождаются дисбалансом цитокинового статуса с гипосекрецией IL-2 и гиперсекрецией цитокинов с противовоспалительной активностью (IL-10, TGF- β) мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*, что предрасполагает к дифференцировке и активации макрофагов по альтернативному пути M2. В то же время показано снижение экспрессии маркера активации HLA-DR на макрофагах у больных ТБ, что свидетельствует о нарушении антигенпрезентирующей функции клеток врожденного иммунитета. Впервые проведено исследование секреции ключевых иммунорегуляторных цитокинов макрофагами *in vitro* при M1- и M2-активации и показано, что у больных ТБ, независимо от клинической формы заболевания и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* к ПТС, повышается секреция как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Продемонстрировано, что при инфильтративном и диссеминированном ТБ в равной степени реализуются механизмы M1- и M2-активации макрофагов с преобладанием функционального фенотипа последних.

Теоретическая и практическая значимость работы. Системная оценка иммунофенотипа субпопуляций макрофагов и цитокинового статуса *in vitro* в клеточных культурах мононуклеарных лейкоцитов и макрофагов у больных ТБ позволила получить новые данные о цитокин-опосредованных патогенетических факторах нарушения баланса дифференцировки провоспалительных и регуляторных макрофагов. Представленные данные значительно отличаются от текущих представлений о механизмах врожденного иммунитета при туберкулезной инфекции. Полученные результаты существенно расширяют фундаментальные знания в области патофизиологии, цитологии и клеточной биологии, углубляют представления о фенотипических характеристиках клеток моноцитарно-макрофагального ряда при ТБ. Высокая пластичность макрофагов дает основание рассматривать эти клетки как важную терапевтическую мишень и является основой для разработки инновационных способов иммунотерапии ТБ. В области фундаментальной науки результаты выполненной диссертационной работы могут быть включены в теоретический задел для дальнейших исследований по поиску маркеров и механизмов программирования функций макрофагов. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования. Исследования проводились в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии на базе кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН О.И. Уразова), в лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины НИ ТГУ (зав. – д-р биол. наук, профессор Ю.Г. Кжышковска) и в лаборатории

молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ (зав. – д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН Н.В. Чердынцева).

Для реализации поставленных задач были обследованы пациенты с впервые выявленным вторичным инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких до начала проведения противотуберкулезной терапии. В качестве материала для исследования использовали венозную кровь, взятую у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких. Основные методы исследования:

1. Подсчет общего количества лейкоцитов и количества моноцитов в крови с помощью гематологического анализатора.
2. Выделение мононуклеарных лейкоцитов (градиентное центрифугирование) и моноцитов (двухступенчатое градиентное центрифугирование с иммуномагнитной сепарацией CD14⁺-клеток) из цельной крови.
3. Трансформация моноцитов в макрофаги *in vitro*.
4. Анализ экспрессии костимулирующих молекул (CD80/86), антигенпрезентирующей молекулы (HLA-DR) и скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на макрофагах и на CD14⁺-моноцитах (CD80, HLA-DR, CD163, CD204) методом проточной цитометрии.
5. Измерение концентрации цитокинов IL-2, IL-10, TGF- β в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов и IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β в супернатантах культуры макрофагов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).
6. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. У больных туберкулезом легких смешанный фенотип моноцитов крови с сочетанной гиперэкспрессией клетками маркера активации HLA-DR и скавенджер-рецепторов (CD163, CD204) формируется в условиях дисбаланса секреции IL-2 (снижение) и противовоспалительных цитокинов IL-10, TGF- β (повышение).
2. Поляризация *in vitro* дифференцировки макрофагов в клетки с противовоспалительным M2-фенотипом у больных диссеминированным и лекарственно-чувствительным туберкулезом легких обусловлена гиперсекрецией макрофагами противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β с иммуносупрессорной активностью.
3. Развитие смешанной популяции M1- и M2-макрофагов при инфильтративном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких связано с повышением *in vitro* секреции макрофагами провоспалительных (IL-1 β , IL-6) и противовоспалительных (IL-10, TGF- β) цитокинов.
4. M2-поляризация функционального фенотипа и дефицит активированных HLA-DR⁺ макрофагов при туберкулезе легких вне зависимости от его клинической формы, лекарственной чувствительности возбудителя и направления *in vitro* индукции клеток (INF- γ или IL-4) свидетельствуют о типовой дисрегуляции врожденного иммунитета вследствие повышения поверхностной экспрессии и секреции макрофагами противовоспалительных молекул.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается высоким уровнем методического обеспечения этапов эксперимента с использованием сертифицированного оборудования и актуальных методов исследования (иммуномагнитная сепарация,

культуральные методы, проточная цитометрия, иммуноферментный анализ). При формировании групп исследования соблюдали критерии включения/исключения больных ТБ и здоровых добровольцев. Размер выборки и характер распределения изучаемых показателей полностью соответствовал используемым методам статистического анализа.

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на Всероссийской итоговой 77-ой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 24-26 апреля 2018 г.); научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии СибГМУ и НИ ТГУ (Томск, 23-24 мая 2019 г.); VII, VIII и XIX Конгрессах «Национальной ассоциации фтизиатров» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г., 25-27 ноября 2019 г., 23-24 ноября 2020 г.); The 8th International Congress of Pathophysiology (Братислава, Словакия, 5-8 сентября 2018 г.); II Объединенном научном форуме (Сочи-Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019 г.); VIII и IX Ежегодных научных конференциях, посвящённых Дню российской науки, «Фтизиатрия сегодня и завтра» (Новосибирск, 7 февраля 2020 г., 8 февраля 2021 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 – в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 зарубежная статья и 10 публикаций (тезисы) в сборниках научных трудов, конференций и конгрессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-315-90018).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 21 таблицей. Библиографический указатель включает 222 источника (12 отечественных и 210 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично. Соискатель самостоятельно выполнял оформление диссертации и автореферата.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, определены цель, основные задачи исследования, научная новизна, практическое и теоретическое значение работы, методология и методы исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ современной научной литературы по теме диссертационного исследования, а именно, описаны особенности врожденного противотуберкулезного иммунитета и иммунопатогенеза различных клинических форм туберкулеза лёгких. Представлена общая

характеристика субпопуляций моноцитов и их участие в патогенезе туберкулезной инфекции. Описано функциональное разнообразие (гетерогенность) субпопуляционного состава тканевых макрофагов, их пластичность и направление дифференцировки в условиях воспаления. Часть главы посвящена описанию роли альвеолярных макрофагов в борьбе с *Mycobacterium tuberculosis*, а также участию цитокинов в иммунопатогенезе ТБ и дифференцировке макрофагов.

Во второй главе диссертации описаны объект, материал и методы исследования. В диссертационную работу включены результаты обследования 47 пациентов (37 мужчин и 10 женщин) с впервые выявленным ТБ: 25 пациентов с инфильтративным ТБ (ИТБ) (21 мужчина и 4 женщины, средний возраст $46,54 \pm 5,24$ лет) и 22 пациента с диссеминированным ТБ (ДТБ) (16 мужчин и 6 женщин, средний возраст $44,56 \pm 8,10$ лет). При этом резистентность *Mtb* к ПТС основного ряда (изониазиду и рифампицину) была диагностирована у 17 пациентов (9 с ИТБ и 8 с ДТБ), а лекарственная чувствительность возбудителя – у 30 больных (у 16 с ИТБ и 14 с ДТБ). Группу сравнения составили 15 здоровых добровольцев (10 мужчин и 5 женщин) сопоставимого возраста ($44,63 \pm 7,31$ лет). В исследование не включали пациентов с аллергией и тяжелыми сопутствующими заболеваниями инфекционного (инфицированные вирусами гепатита и ВИЧ) и неинфекционного генеза (с сахарным диабетом, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких). В исследование не были включены пациенты, получавшие на момент исследования терапию ПТС, глюкокортикостероидами, нестероидными противовоспалительными и иммуностимулирующими препаратами.

Исследования проведены с разрешения локального этического комитета (протокол № 5648 от 27 ноября 2017 г.). У всех обследуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных ТБ в количестве 30 мл. У больных ТБ забор крови осуществлялся однократно до начала курса противотуберкулезной химиотерапии в момент разгара заболевания.

Общее количество лейкоцитов (ОКЛ) и содержание моноцитов определяли на гематологическом анализаторе («ABX MICROS 60», Франция).

Для трансформации моноцитов в макрофаги цельную венозную кровь в количестве 30 мл забирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (K_3 -ЭДТА). Кровь разводили 1:1 PBS (фосфатно-солевым буфером) и наслаивали на 15 мл фиколла с плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$. Образцы центрифугировали 30 мин при $0,016 \text{ g}$. Полученную мононуклеарную фракцию собирали и дважды отмывали PBS. 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 (БСА), ЭДТА и 0,09% азид) и магнитных $CD14^+$ -частиц («Micro Beads», Германия), инкубировали 40 мин. Полученная суспензия подвергалась позитивной магнитной сепарации по протоколу компании «Miltenyi Biotec» (Германия). Моноциты культивировали в полной питательной среде X-

VIVO 10, With Gentamicin and Phenol Red («Lonza», Швейцария) в концентрации 1×10^6 клеток/мл с добавлением 5 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF; «RnD Systems», США). Для дополнительной индукции клеток использовали рекомбинантные цитокины – IL-4 (10 нг/мл; «PeproTech», США) (для M2-активации клеток) и IFN- γ (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 суток в CO₂-инкубаторе при 37°C и 7,5% CO₂.

Оценку иммунофенотипических параметров моноцитов проводили с использованием моноклональных антител CD14, CD45, CD80, CD163, CD204, HLA-DR («eBioscience», США). Для этого цельную кровь в количестве 100 мкл переносили в пробирки для цитометра и добавляли по 2 мкл соответствующих меток. Разрушение эритроцитов проводили добавлением к пробам лизирующего раствора (BD Lysing Solution, США). Фенотипирование макрофагов, трансформированных из CD14⁺-моноцитов крови, проводили на шестые сутки культивирования с использованием моноклональных антител к CD80, CD86, CD163, CD204, CD206, HLA-DR («eBioscience», США). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX («Beckman Coulter», США). Полученные данные обрабатывали при помощи программного приложения «CytExpert 2.0» («Beckman Coulter», США).

Содержание цитокинов в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью коммерческих наборов для определения интерлейкинов «IL-2-ИФА-БЕСТ», «IL-10-ИФА-БЕСТ», «IL-1 бета-ИФА-БЕСТ», «IL-6-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), трансформирующего фактора роста β (TGF- β) («BCM Diagnostics», США). Оптическую плотность регистрировали на анализаторе Multiskan EX («Thermo Electron Corporation», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Для проведения статистической обработки данных использовали статистический пакет «SPSS Statistica» версия 17.0 и Microsoft Excel. Проводили проверку на нормальность распределения количественных показателей. Анализировали количественные данные сравнением независимых выборок с помощью дисперсионного критерия Краскала-Уоллеса. Парный анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для статистического описания результаты представляли в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей (1-го и 3-го квартилей: Q₁ и Q₃). Для оценки зависимости между двумя количественными показателями применяли вычисление рангового коэффициента корреляции Спирмена. Оценку тесноты связи определяли по абсолютной величине коэффициента корреляции r (по шкале Чеддока). Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Определено общее количество лейкоцитов и абсолютное и относительное содержание моноцитов в крови у здоровых доноров и больных ТБ. Изучен фенотип CD14-позитивных моноцитов и макрофагов, а также проведена оценка общего цитокинового статуса и секреции цитокинов в культуре макрофагов у больных ТБ в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТС. Глава иллюстрирована таблицами.

В четвертой главе проведен анализ и обсуждение полученных оригинальных данных с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

Известно, что моноциты, еще находясь в циркуляции, в процессе миграции в очаг воспаления могут экспрессировать маркеры поляризации в направлении как M1-, так и M2-активации в зависимости от общего цитокинового статуса [Kzhyshkowska J. et al., 2006; Cassetta L. et al., 2011; Martinez F.O., Gordon S., 2012; Ren F. et al., 2014; Piazzon M.C. et al., 2016].

В результате фенотипирования моноцитов установлено, что при снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов в крови у больных ТБ независимо от его клинической формы и чувствительности *Mtb* к ПТС отмечается высокая экспрессия маркеров активации клеток как по провоспалительному фенотипу M1 (HLA-DR-позитивные моноциты), так и по противовоспалительному фенотипу M2 (CD163- и CD204-позитивные моноциты). Изменения оказались наиболее выраженными у больных ДТБ на фоне снижения общего количества моноцитов в крови при данной форме заболевания. Интересно, что экспрессия костимулирующей молекулы CD80 на моноцитах крови не отличалась от группы контроля во всех обследованных группах больных ТБ (Таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Содержание CD14⁺-моноцитов, экспрессирующих молекулы CD80, CD163, CD204, HLA-DR, в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, % (Me (Q₁–Q₃))

Группы обследованных лиц	CD14 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD80 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD163 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD204 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ клетки, %
Здоровые доноры (n=15)	88,01 (77,23–91,72)	1,11 (0,64–2,13)	10,22 (6,14–25,01)	1,12 (1,32–3,90)	50,51 (34,04–59,17)
Больные ИТБ (n=25)	75,12 (56,43–96,51) p ₁ =0,012	1,72 (0,56–1,92)	21,01 (10,12–37,10) p ₁ =0,014	3,11 (1,51–7,01)	78,24 (60,51–89,52) p ₁ =0,012
Больные ДТБ (n=22)	73,22 (39,27–87,56) p ₁ =0,021	1,53 (0,71–1,82)	45,67 (37,71–53,62) p ₁ =0,021 p ₂ =0,023	7,01 (1,73–12,54) p ₁ =0,013 p ₂ =0,012	66,54 (32,22–80,23) p ₁ =0,031 p ₂ =0,022

Примечание. p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров; p₂ – у больных ИТБ.

Поверхностный рецептор CD163 на макрофагах функционирует для распознавания паттернов патогенности бактерий, а его экспрессия может быть механизмом снижения острой и тяжелой воспалительной реакции [Fabriek V.O. et al., 2009]. Логично, что моноциты и макрофаги, экспрессирующие CD163, должны обладать регуляторными и восстановительными свойствами для своевременного ограничения иммунного ответа, повреждающего ткани.

Таблица 2 – Содержание CD14⁺-моноцитов, экспрессирующих молекулы

CD80, CD163, CD204, HLA-DR, в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТС, % (Me (Q₁–Q₃))

Группы обследованных лиц	CD14 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD80 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD163 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ CD204 ⁺ клетки, %	CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ клетки, %
Здоровые доноры (n=15)	88,01 (77,23–91,72)	1,11 (0,64–2,13)	10,22 (6,14–25,01)	1,12 (1,32–3,90)	50,51 (34,04–59,17)
Больные ЛЧ ТБ (n=30)	75,13 (61,22–87,01) p ₁ =0,031	1,03 (0,51–1,52)	45,23 (35,12–54,22) p ₁ =0,015	6,91 (2,44–9,23) p ₁ =0,014	72,21 (63,12–83,41) p ₁ =0,033
Больные ЛУ ТБ (n=17)	76,22 (59,21–90,11) p ₁ =0,014	0,82 (0,56–1,82)	37,21 (23,50–44,7) p ₁ =0,033	7,31 (2,55–9,57) p ₁ =0,021	79,56 (63,57–86,51) p ₁ =0,012

Примечание. p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров.

При оценке противовоспалительного потенциала моноцитов, наряду с молекулой CD163, была исследована экспрессия на их поверхности маркера CD204 – акцепторного скавенджер-рецептора класса А (SR-A), который экспрессируется на макрофагах и их предшественниках (моноцитах), дендритных клетках и эпителиальных клетках дыхательных путей. Это многофункциональный рецептор с широким лиганд-связывающим потенциалом [Dieudonné A. et al., 2012; Canton J., 2013]. CD204 распознает модифицированные липопротеины, апоптотические клетки, патоген-ассоциированные молекулы [Kubota K. et al., 2017]. Эксперименты на CD204-нокаутных мышей показали, что экспрессия CD204 играет важную роль в поляризации макрофагов по направлению M2 за счет ингибирования передачи сигналов через Toll-подобный рецептор (TLR) [Kaku Y. et al., 2014].

Известно, что HLA-DR конститутивно экспрессируется на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Моноциты здоровых людей экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR с высокой степенью плотности. Экспрессия маркера на моноцитах имеет ключевое значение для презентации микробных пептидов Т-клеткам, что способствует инициации адаптивного иммунного ответа [Zhuang Y. et al., 2017]. Моноциты и макрофаги со сниженной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антигенпрезентирующую функцию. Изменение экспрессии HLA-DR на моноцитах/макрофагах считается оптимальным маркером динамики иммунного ответа у пациентов в критическом состоянии, например, при развитии сепсиса [Venet F. et al., 2013]. Снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах описано при травмах, после операций, при остром панкреатите и обширных ожогах [Monneret G. et al., 2006; Monneret G. et al., 2008]. Имеются данные о том, что при развитии внутрибольничной инфекции снижение экспрессии на моноцитах HLA-DR в дальнейшем способствовало развитию бактериемии [Poehlmann H. et al., 2009; Grimaldi D. et al., 2011]. Установленную нами высокую экспрессию HLA-DR на поверхности моноцитов у больных ТБ, в целом, можно рассматривать как позитивную тенденцию. Наличие

маркера активации свидетельствует о сохранении антигенпрезентирующей функции клеток в ответ на проникновение *Mtb* в организм хозяина. Отметим, что у больных ИТБ экспрессия провоспалительного маркера HLA-DR на CD14⁺-моноцитах была на 15% выше, чем у больных с ДТБ (Таблица 1).

Исследование *in vitro* секреторной функции мононуклеарных лейкоцитов крови показало, что в группе больных с диссеминированным лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТБ дефицит секреции IL-2 был более выраженным, чем при диссеминированном лекарственно-чувствительном (ЛЧ) ТБ. Уровень VCG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* при инфильтративном и диссеминированном ТБ оказался ниже, чем в контрольной группе, независимо от чувствительности возбудителя к ПТС. Обнаружено, что при лекарственно-чувствительном ИТБ возрастает уровень базальной и VCG-стимулированной секреции IL-10 *in vitro*. Анализ секреции TGF- β в культуре мононуклеарных лейкоцитов периферической крови *in vitro* показал наличие разнонаправленных ее изменений у больных ТБ. У пациентов с диссеминированным ЛУ ТБ отмечалось значительное увеличение секреции данного медиатора (базальной и VCG-индуцированной), тогда как при инфильтративном ЛУ ТБ секреция цитокина снижалась. Ниже нормы уровень секреции TGF- β оказался также при индукции клеток вакцинным штаммом VCG при лекарственно-чувствительном ДТБ.

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что у больных ИТБ ведущим медиатором, способствующим поляризации иммунных реакций в направлении противовоспалительного ответа с формированием иммунной толерантности, является IL-10, а снижение секреции «медиатора фиброза» TGF- β при ИТБ может рассматриваться как относительно благоприятный фактор, препятствующий диссеминации *Mtb* [Churina E.G. et al., 2012]. Поскольку у пациентов с диссеминированным ЛУ ТБ секреция TGF- β возрастала в ответ на индукцию суспензионной культуры клеток вакциной VCG, можно судить о высокой реактивности мононуклеарных лейкоцитов крови при этой клинической форме болезни.

Таким образом, повышение численности противовоспалительных моноцитов – предшественников M2-макрофагов, у больных ТБ свидетельствует о вероятной поляризации дифференцировки клеток врожденного иммунитета в процессе миграции из костного мозга в ткани (в том числе, в легкие). Данные изменения, в целом, соответствуют особенностям иммунофенотипа макрофагов, трансформированных из моноцитов крови *in vitro*, под действием факторов активации.

Посредством изучения цитокинового профиля макрофагов было проанализировано, какой вклад ключевые гуморальные продукты макрофагов вносят в направление поляризации дифференцировки клеток *in vitro* у больных ТБ путем реализации механизмов цитокиновой регуляции.

Оценка цитокин-секреторной активности макрофагов *in vitro* позволила установить повышение секреции ими ключевых провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТС.

При этом повышение уровня секреции провоспалительных цитокинов у больных ИТБ и ЛУ ТБ ассоциировалось с увеличением экспрессии на макрофагах костимулирующих молекул – провоспалительных маркеров CD80 и CD86. При

ЛУ-варианте течения заболевания экспрессия молекулы CD80 резко повышалась по сравнению с ЛЧ ТБ как при М1-, так и при М2-активации макрофагов. При ИТБ было выявлено значительное увеличение числа CD80-позитивных клеток по сравнению с ДТБ, особенно при М1-стимуляции. В обеих клинических группах регистрировалось повышение экспрессии CD86 в ответ на индукцию клеточной культуры макрофагов IFN- γ (Таблицы 3 и 4).

Интересно, что экспрессия на макрофагах маркера активации HLA-DR, напротив, снижалась у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТС как в отсутствие стимуляции, так и после добавления цитокинов (Таблицы 3 и 4).

Известно, что костимулирующие молекулы CD80 и CD86 являются членами семейства молекул В7 [Peyravian N. et al., 2018]. Маркеры CD80 и CD86 обнаружены не только на дендритных клетках, активированных В-клетках и макрофагах, но и на непрофессиональных антигенпрезентирующих клетках [Scarpa M. et al., 2015].

Молекула CD80, очень часто в тандеме с CD86, играет важную роль в регуляции как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Эти молекулы являются лигандами для рецептора CD28 на наивном Т-лимфоците и их взаимодействие – важный костимулирующий сигнал в иммунологическом синапсе между макрофагом и Т-клеткой, который приводит к активации, пролиферации и дифференцировке Т-клеток в необходимом направлении [Tae A.G. et al., 2018]. CD80 является ключевым маркером активации макрофагов и в отсутствие антигенной нагрузки он не экспрессируется на клетках [Wang L.X. et al., 2013]. При воспалении взаимодействие макрофага через антиген главного комплекса гистосовместимости МНС-II с рецептором на Т-клетке приводит к активации CD80 [Mercy R. et al., 2017].

Скавенджер-рецептор CD206 связывает структуры с высоким содержанием маннозы на поверхности потенциально патогенных бактерий, вирусов и грибов [Barreto-Bergter E., Figueiredo R.T., 2014]. Маннозный рецептор CD206 считается одним из основных маркеров «альтернативной» активации макрофагов [Joerink M. et al., 2011]. Он играет важную роль в иммунном гомеостазе, высокая экспрессия рецептора обнаруживается на клетках микроокружения опухоли [Azad K. et al., 2014]. Молекула CD206 представляет собой лектин С-типа или маннозный рецептор класса 1 (MR1), который обычно экспрессируется на тканевых макрофагах, незрелых дендритных клетках, эндотелиоцитах, но фактически не экспрессируется на моноцитах [Ярилин А.А., 2010]. В связи с этим, в настоящей работе мы не исследовали экспрессию маркера на моноцитах, ограничившись определением CD206-позитивных макрофагов.

По результатам оценки *in vitro* секреции провоспалительных цитокинов, у больных ДТБ и ЛЧ ТБ уровень секреции IL-6 изменялся также, как и при ИТБ. При этом максимальная секреция IL-1 β у больных ДТБ и ЛЧ ТБ регистрировалась при индукции клеток IFN- γ . Однако повышенная концентрация провоспалительных цитокинов в данных клинических группах не сопровождалась увеличением экспрессии молекул костимуляции CD80/86, как при ИТБ и ЛУ ТБ. Экспрессия CD86 после индукции клеток цитокинами IL-4 и IFN- γ снижалась.

Таблица 3 – Экспрессия провоспалительных M1-маркеров на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, % (Me (Q₁–Q₃))

Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN-γ
CD80	Здоровые доноры (n=15)	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ИТБ (n=25)	48,60 (24,17–51,14) p ₁ =0,014	41,61 (20,15–53,23) p ₁ =0,015	58,50 (28,73–70,35) p ₁ =0,021 p ₄ =0,014
	Больные ДТБ (n=22)	12,23 (8,42–25,13) p ₁ =0,012 p ₂ =0,022	11,65 (8,01–26,13) p ₂ =0,031	18,70 (9,34–28,27) p ₂ =0,012
CD86	Здоровые доноры (n=15)	11,12 (8,52–28,01)	43,51 (32,53–54,55) p ₃ =0,012	23,22 (10,01–31,14) p ₃ =0,016 p ₄ =0,025
	Больные ИТБ (n=25)	16,54 (9,22–27,63)	19,12 (8,56–23,14) p ₁ =0,021	27,02 (15,23–39,14) p ₃ =0,015 p ₄ =0,034
	Больные ДТБ (n=22)	14,14 (9,37–21,52)	13,48 (4,73–19,04) p ₁ =0,012	15,52 (7,14–25,37) p ₁ =0,013 p ₂ =0,012
HLA-DR	Здоровые доноры (n=15)	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
	Больные ИТБ (n=25)	75,44 (51,51–87,53) p ₁ =0,012	67,51 (45,63–78,42) p ₁ =0,013	62,51 (44,72–83,43) p ₁ =0,024
	Больные ДТБ (n=22)	71,12 (51,33–83,72) p ₁ =0,021	57,71 (33,62–77,71) p ₁ =0,022 p ₃ =0,025	74,16 (42,74–84,23) p ₁ =0,017 p ₄ =0,014

Примечание. p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров; p₂ – у больных ИТБ; p₃ – при *in vitro* культивировании клеток без стимуляции; p₄ – при *in vitro* культивировании клеток с IL-4 (M2-стимуляция).

Таблица 4 – Экспрессия провоспалительных M1-маркеров на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТС, % (Me (Q₁–Q₃))

Маркеры макрофагов	Группы обследованных лиц	Условия культивирования макрофагов <i>in vitro</i>		
		Без стимуляции	При стимуляции IL-4	При стимуляции IFN-γ
CD80	Здоровые доноры (n=15)	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ЛЧ ТБ (n=30)	11,01 (9,21–26,63) p ₁ =0,041	12,22 (10,02–28,41)	23,55 (11,5–34,24) p ₃ =0,025 p ₄ =0,017
	Больные ЛУ ТБ (n=17)	51,22 (23,11–68,33) p ₁ =0,015 p ₂ =0,022	62,33 (37,21–71,42) p ₁ =0,037 p ₂ =0,025 p ₃ =0,027	61,22 (32,45–70,66) p ₁ =0,026 p ₂ =0,022 p ₃ =0,011
CD86	Здоровые доноры (n=15)	11,12 (8,52–28,01)	43,51 (32,53–54,55) p ₃ =0,010	23,22 (10,01–31,14) p ₃ =0,015 p ₄ =0,024
	Больные ЛЧ ТБ (n=30)	14,02 (8,51–21,44)	13,54 (10,25–25,11) p ₁ =0,031	17,23 (10,32–28,55)
	Больные ЛУ ТБ (n=17)	18,22 (9,25–30,45) p ₁ =0,030	25,23 (14,01–36,12) p ₁ =0,042 p ₂ =0,010	34,45 (18,23–41,56) p ₁ =0,024 p ₂ =0,014 p ₃ =0,012 p ₄ =0,021
HLA-DR	Здоровые доноры (n=15)	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
	Больные ЛЧ ТБ (n=30)	69,23 (56,25–86,12) p ₁ =0,012	55,12 (43,22–75,23) p ₁ =0,022 p ₃ =0,011	66,23 (42,5–84,23) p ₁ =0,031 p ₃ =0,015
	Больные ЛУ ТБ (n=17)	80,23 (59,12–94,54) p ₁ =0,044 p ₂ =0,012	76,12 (49,52–90,13) p ₁ =0,034 p ₂ =0,012	72,12 (57,32–86,42) p ₁ =0,035 p ₂ =0,014

Примечание. p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров; p₂ – у больных с ЛЧ ТБ; p₃ – при *in vitro* культивировании клеток без стимуляции; p₄ – при *in vitro* культивировании клеток с IL-4 (M2-стимуляция).

Для оценки противовоспалительной и толерогенной функциональной активности макрофагов нами были выбраны цитокины с иммуносупрессорной активностью IL-10 и TGF- β . Мы установили, что повышение концентрации противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β в супернатантах макрофагальных клеток во всех группах больных ТБ, независимо от чувствительности возбудителя к ПТС, ассоциировано с увеличением экспрессии скавенджер-рецепторов на поверхности макрофагов (CD163, CD204, CD206).

При оценке взаимосвязей между экспрессией скавенджер-рецепторов (CD163, CD204, CD206) на поверхности макрофагов и *in vitro* секрецией трансформированными макрофагами противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF- β) во всех группах больных ТБ независимо от чувствительности возбудителя к ПТС регистрировалось наличие прямых корреляций разной силы (Рисунки 1, 2).

Проведенный корреляционный анализ показал наличие прямой положительной взаимосвязи у больных ИТБ и ЛУ ТБ между экспрессией макрофагами молекул костимуляции CD80/86 и *in vitro* секрецией ими провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 (Рисунок 1). При этом у больных ДТБ и ЛЧ ТБ значимых взаимосвязей между экспрессией молекул костимуляции CD80/86 и секрецией *in vitro* макрофагами провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 не было выявлено (Рисунок 2).

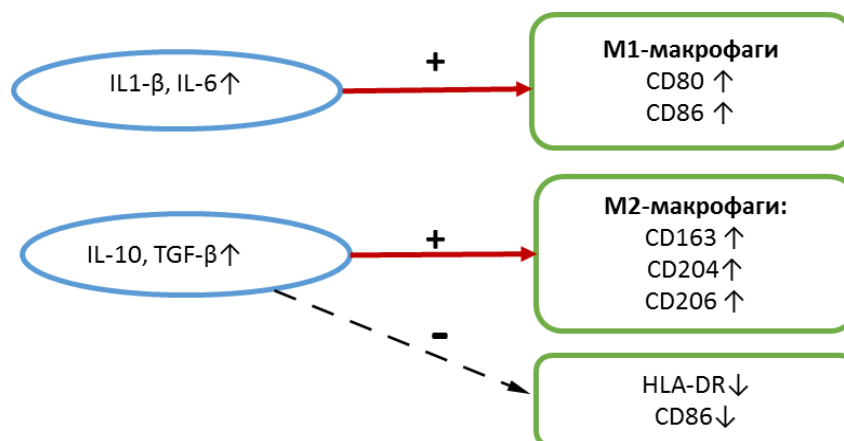


Рисунок 1. Роль цитокинов в направлении дифференцировки макрофагов у больных инфильтративным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких.

Примечание. Здесь и в рисунке 2: сплошные стрелки – активирующее влияние; пунктирная стрелка – ингибирующее влияние; «+» – наличие положительной корреляционной взаимосвязи; «-» – наличие отрицательной корреляционной взаимосвязи; IL – интерлейкин; TGF – трансформирующий фактор роста (β); CD – кластер дифференцировки иммунокомпетентных клеток; HLA-DR – молекула главного комплекса гистосовместимости.

В результате анализа взаимосвязей между секрецией *in vitro* макрофагами противовоспалительных цитокинов IL-10, TGF- β и экспрессией на макрофагах молекул костимуляции CD80/86 и молекулы активации HLA-DR, между ними было зарегистрировано наличие отрицательных обратных корреляций во всех группах больных туберкулезом легких (Рисунки 1 и 2).

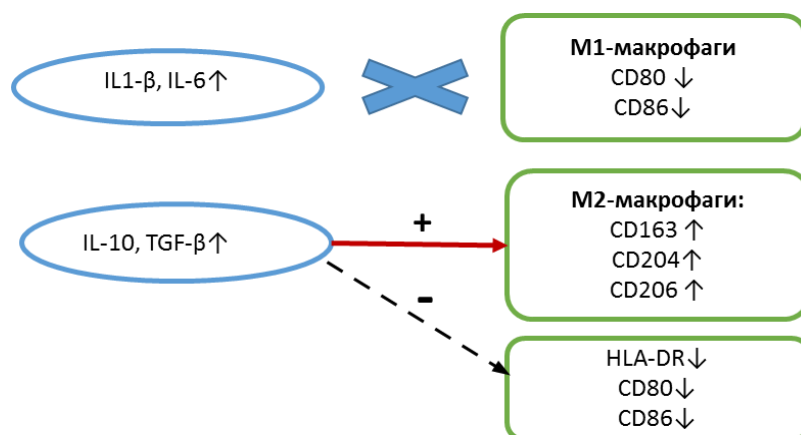


Рисунок 2. Роль цитокинов в направлении дифференцировки макрофагов у больных диссеминированным и лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

В литературе, как уже было описано ранее, имеются новые данные о том, что популяция макрофагов, участвующих в борьбе с *Mtb*, неоднородна [Weiss G., 2015; Khan, A. et al., 2019]. Опубликован ряд работ, подтверждающих присутствие в легких одновременно M1- и M2-макрофагов при других заболеваниях дыхательной системы. Изучено, что у курильщиков с ХОБЛ макрофаги не «вписываются» в классическую M1/M2-дихотомию, и, скорее всего, воспалительное окружение дыхательных путей стимулирует развитие M1- и M2-клеток одновременно [Hodge S., 2011; Draijer C., 2013]. Показано, что оба типа макрофагов вовлечены в патогенез бронхиальной астмы [Moreira A.P., Nogaboam S.M., 2011]. С помощью генного транскрипционного анализа при цитомегаловирусной инфекции был обнаружен M1-фенотип макрофагов, однако спектр выделяемых клетками цитокинов соответствовал как M1-, так и M2-фенотипу [Chan G. et al., 2008].

Таким образом, оценка экспрессии мембранных молекул B7 (CD80/86) и HLA-DR на макрофагах у больных ТБ позволяет сделать вывод о нарушениях противотуберкулезного врожденного иммунитета на стадии презентации антигена во всех группах больных ТБ и экспрессии молекул костимуляции при ДТБ и ЛЧ ТБ. Увеличение экспрессии макрофагами поверхностных молекул CD80 (при M1- и M2-стимуляции) и CD86 (при M1-стимуляции) у больных ИТБ и ЛУ ТБ, напротив, свидетельствует о повышении реактивности клеток.

Наряду с этим, дефицит экспрессии на макрофагах HLA-DR (ключевого маркера провоспалительной активации клеток) во всех группах больных ТБ можно рассматривать как общий патогенетический фактор иммунологической недостаточности с нарушением в системе врожденного иммунитета при туберкулезной инфекции.

Снижение экспрессии провоспалительных маркеров (CD80/86) у больных ДТБ и ЛЧ ТБ с сохранением секреции провоспалительных цитокинов указывает на инертность макрофагов при воздействии воспалительных стимулов (в том числе IFN-γ) и реализацию ими толерогенного потенциала, тем самым предопределяя ухудшение прогноза заболевания (Рисунок 3).

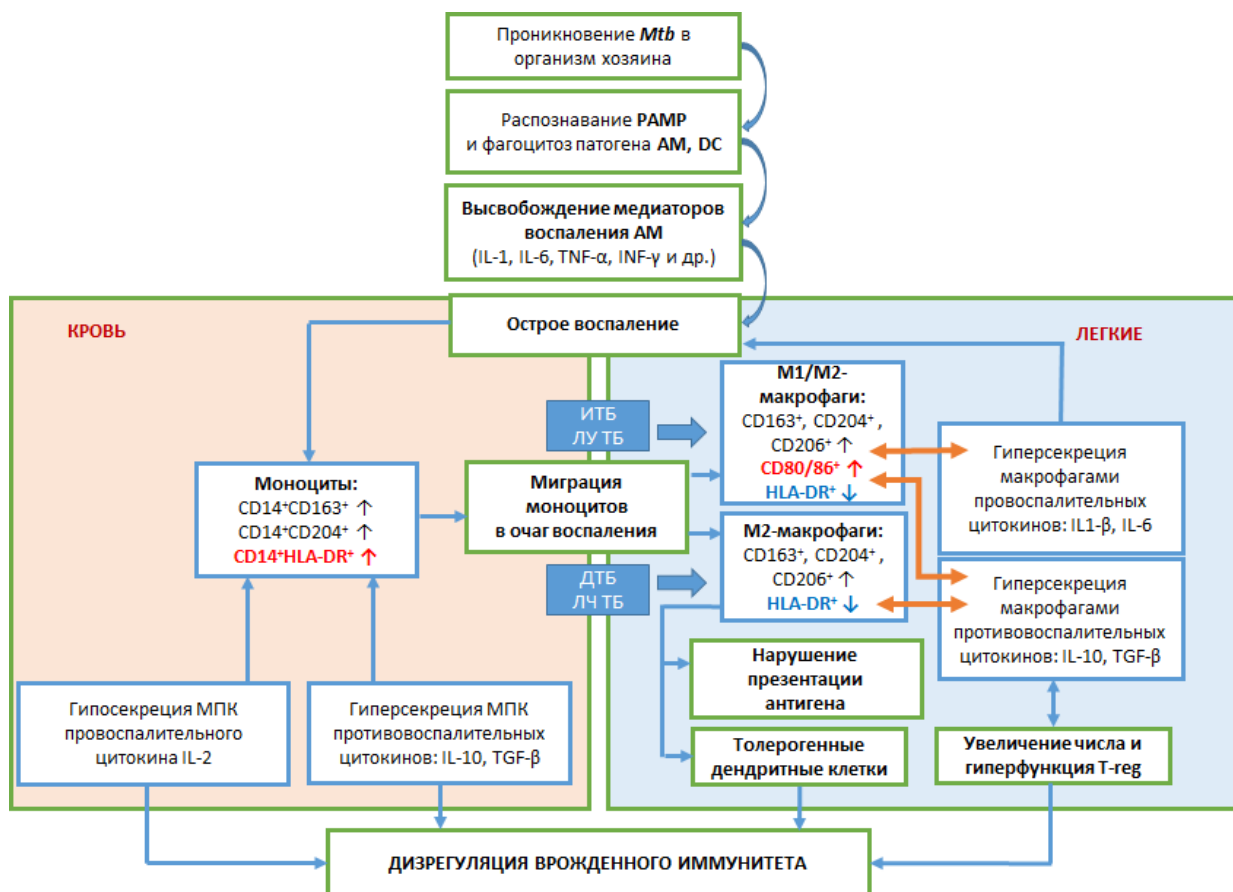


Рисунок 3. Роль M1- и M2-макрофагов в патогенезе туберкулеза легких.

Примечание: *Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*; *PAMP* – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн; *AM* – альвеолярные макрофаги; *MPC* – мононуклеарные лейкоциты периферической крови; *DC* – дендритные клетки; *T-reg* – регуляторные T-клетки; *CD* – кластер дифференцировки иммунокомпетентных клеток; *HLA-DR* – молекулы главного комплекса гистосовместимости; *TLR* – толл-подобные рецепторы; *IL* – интерлейкин; *INF* – интерферон; *TNF* – фактор некроза опухоли; *TGF* – трансформирующий фактор роста; *ИТБ* – инфильтративный туберкулез легких (ТБ); *ДТБ* – диссеминированный ТБ; *ЛУ ТБ* – лекарственно-устойчивый ТБ; *ЛЧ ТБ* – лекарственно-чувствительный ТБ; сплошные стрелки – положительное (активирующее) влияние; зеленые прямоугольники – данные литературы; синие прямоугольники – результаты собственных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Общее количество $CD14^+$ -моноцитов крови у больных туберкулезом легких независимо от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя снижается на фоне повышения относительного числа $CD14^+$ -моноцитов, экспрессирующих скавенджер-рецепторы $CD163$, $CD204$ (противовоспалительный фенотип) и маркер активации $HLA-DR$ (провоспалительный фенотип); экспрессия молекулы костимуляции $CD80$ на $CD14^+$ -моноцитах соответствует норме.
2. Направление дифференцировки моноцитов крови в клетки со смешанным (про-

- и противовоспалительным) фенотипом у больных туберкулезом легких определяется дисбалансом цитокинового статуса – дефицитом секреции IL-2 при повышении секреции противовоспалительных медиаторов – IL-10 (при инфильтративном лекарственно-чувствительном туберкулезе) и TGF-β (при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе).
3. Снижение числа клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR, при *in vitro* трансформации CD14⁺-моноцитов крови в макрофаги у больных туберкулезом легких свидетельствует о поляризации функционального фенотипа макрофагов с нарушением способности клеток к презентации антигена. Она носит типовой характер, поскольку не зависит от условий *in vitro* индукции клеток (M1-активация с INF-γ или M2-активация с IL-4), клинической формы болезни и лекарственной чувствительности возбудителя.
 4. Нестимулированная и индуцированная IFN-γ (M1-активация) и IL-4 (M2-активация) *in vitro* секреция макрофагами IL-10 и провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6) у больных туберкулезом легких выше, чем у здоровых доноров. При этом *in vitro* секреция TGF-β претерпевает разнонаправленные изменения в зависимости от типа индукции макрофагов – повышается при M1-стимуляции и снижается при M2-стимуляции клеток. Наибольший уровень нестимулированной *in vitro* секреции IL-10 и TGF-β отмечается у больных диссеминированным туберкулезом легких.
 5. У больных диссеминированным и лекарственно-чувствительным туберкулезом легких при *in vitro* трансформации макрофагов высокая секреция иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF-β положительно коррелирует с повышением экспрессии скавенджер-рецепторов CD163, CD204, CD206 на клетках, что соответствует противовоспалительному (регуляторному) M2-фенотипу макрофагов.
 6. У больных инфильтративным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких при *in vitro* трансформации макрофагов высокий уровень сочетанной экспрессии скавенджер-рецепторов и молекул костимуляции CD80/CD86 на клетках во взаимосвязи с гиперсекрецией цитокинов с провоспалительной (IL-1β, IL-6) и противовоспалительной (IL-10, TGF-β) активностью свидетельствует о поляризации дифференцировки макрофагов в субпопуляцию клеток с фенотипами M1 и M2.
 7. Патогенез поляризации *in vitro* дифференцировки макрофагов в клетки с противовоспалительным (M2) или смешанным (M1/M2) фенотипом при туберкулезе легких обусловлен секрецией макрофагами профильных про- и противовоспалительных цитокинов, активность которой зависит от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности его возбудителя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. The number of Foxp3-expressing and $\gamma\delta$ T regulatory cells at multidrug-resistant pulmonary tuberculosis / Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Sitnikova A.V. // **Pathophysiology**. – 2018. – Vol. 25, N 3. – P. 230-231. IF 2,381.
2. Содержание галектинов-2, -9 и субпопуляций моноцитов крови при патологии легких инфекционного и неинфекционного генеза / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Новицкий В.В. // **Российский иммунологический журнал**. – 2019. – Т.13 (22), №2. – С. 966-969. Импакт-фактор РИНЦ 0,668.
3. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Кошель А.П., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Гарганеева Н.П., Новицкий В.В. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2019. – Т.18, №1. – С. 277-285. Импакт-фактор РИНЦ 0,643.
4. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор) / Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В., Береснева А.Е., Новицкий В.В. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2019. – Т.18, №1. – С. 142-154. Импакт-фактор РИНЦ 0,643.
5. Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких / Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Ситникова А.В., Бармина С.Э. // **Медицинская иммунология**. – 2019. – Т. 21, №1. – С. 149-156. Импакт-фактор РИНЦ 0,874.
6. Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких / Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Новицкий В.В., Кононова Т.Е., Чумакова С.П., Патышева М.Р. // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2020. Т. 64, № 4. – С. 79-87. Импакт-фактор РИНЦ 0,450.
7. Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких / Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Новицкий В.В., Голубчиков П.Н., Степанова Е.П. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2020. – Т. 19, №4. – С. 179-188. Импакт-фактор РИНЦ 0,643.
8. Функциональная активность $\gamma\delta$ T-клеток у больных туберкулезом легких / Ситникова А.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И. // Сб. «Всероссийская итоговая 77-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова (г. Томск, 24-26 апреля 2018 г.): сборник материалов» / под ред. Г.Э. Черногорюка. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2018. – С. 499-500.
9. Роль дендритных и регуляторных T-клеток в патогенезе туберкулеза легких / Чурина Е.Г., Уразова О.И., Хасанова Р.Р., Ситникова А.В. // Сб. «VII конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (г. Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.): [Электронный ресурс]: тезисы докладов / под ред. д-ра мед. наук, проф. П.К. Яблонского (президент конгресса)». – СПб., 2018. – С. 208-210. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

10. Фенотипическая гетерогенность моноцитов крови у больных туберкулезом легких / Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Чумакова С.П., Патышева М.Р., Степанова Е.П., Голубчиков П.Н. // Сб. «VIII Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров»: Материалы VIII конгресса национальной ассоциации фтизиатров (г. Санкт-Петербург, 25-27 ноября 2019 г.). – СПб., 2019. – С. 333-334.
11. Характеристика субпопуляционного состава моноцитов крови при патологии легких инфекционного и неинфекционного генеза [Электронный ресурс] / Винс М.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Кошель А.П., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Новицкий В.В. // Сб. «Материалы Балтийского симпозиума по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине с международным участием», Научное электронное издание, г. Калининград, 22-23 ноября 2018 г. / под ред. Л.С. Литвиновой, А.Г. Гончарова. – Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта. – 2018. – С. 59-61. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=36588003>
12. Изменения субпопуляционного состава моноцитов крови при туберкулезе легких как типовая реакция моноцитарно-макрофагальной системы / Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Крук Е.А., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Новицкий В.В. // Сб. «VII конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.): [Электронный ресурс]: тезисы докладов / под ред. д-ра мед. наук, проф. П.К. Яблонского (президент конгресса)». – СПб., 2018. – С. 204-206. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
13. Клеточные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе туберкулеза легких / Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Хасанова Р.Р., Чумакова С.П., Винс М.В. // Сб. «VII конгресс Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.): [Электронный ресурс]: тезисы докладов / под ред. д-ра мед. наук, проф. П.К. Яблонского (президент конгресса)». – СПб., 2018. – С. 206-207. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
14. Продукция противовоспалительных цитокинов *in vitro* у больных туберкулезом легких / Ситникова А.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В. // Сб. «Материалы научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии Сибирского государственного медицинского университета и Томского государственного университета, Томск, 23-24 мая 2019 г.». – Томск, 2019. – С. 213-214.
15. Субпопуляционный состав моноцитов крови при заболеваниях, сопряженных с гипоксией / Винс М.В., Чумакова С.П., Уразова О.И., Крук Е.А., Букреева Е.Б., Буланова А.А., Майнагашева Е.С., Погонченкова Д.А., Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Новицкий В.В. // Сб. «Материалы научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии Сибирского государственного медицинского

университета и Томского государственного университета, Томск, 23-24 мая 2019 г.». – Томск, 2019. – С. 37-39.

16. Аллельный полиморфизм генов цитокинов: роль в патогенезе туберкулеза легких / Уразова О.И., Чурина Е.Г., Хасанова Р.Р., Кононова Т.Е., Ситникова А.В., Винс М.В. // АСТА NATURA: Научные труды II Объединенного научного форума / под. ред. Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова и др., Сочи-Дагомыс, 1-6 октября 2019 г. – 2019. – Спецвыпуск, Т. 1. – С. 55-56.

17. Экспрессия провоспалительных маркеров на моноцитах и макрофагах у больных туберкулезом легких / Ситникова А.В., Чурина Е.Г., Уразова О.И., Патышева М.Р., Степанова Е.П., Голубчиков П.Н. // Сб. «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке: Сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета / под ред. члена-корреспондента РАН О.И. Уразовой. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2020». – С. 111-112.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДТБ – диссеминированный туберкулез

ИТБ – инфильтративный туберкулез

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛУ – лекарственная устойчивость

ЛЧ – лекарственная чувствительность

МКАТ – моноклональные антитела

ОКЛ – общее количество лейкоцитов

ПТС – противотуберкулезные средства

ТБ – туберкулез легких

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

IFN – interferon (интерферон)

IL – interleukin (интерлейкин)

Mtb – Mycobacterium tuberculosis (микобактерия туберкулеза)

TGF – transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

Th – T-helper (Т-хелпер)