

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.24-002.5-078.33:577.175.14:612.017.1:616.155.33-076.5:57.032

**Чурина Е.Г.^{1,2}, Уразова О.И.^{1,3}, Ситникова А.В.¹, Новицкий В.В.^{1,3}, Кононова Т.Е.¹,
Чумакова С.П.¹, Патышева М.Р.^{2,4}**

Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких

¹Сибирский государственный медицинский университет, Минздрава России, 634050, Томск, Россия;²Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, Россия;³Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники, 634050, Томск, Россия;⁴Научно-исследовательский институт онкологии, Томский научно-исследовательский медицинский центр РАН, 634009, Томск, Россия

Введение. При клинической манифестации туберкулеза легких альвеолярные макрофаги накапливают микобактерии и перестают выполнять свои эффекторные функции. Это связано с конверсией их провоспалительного фенотипа М1 в противовоспалительный М2, что способствует хронизации инфекции. Научная гипотеза исследования предполагает влияние цитокинового статуса организма на поляризацию моноцитов в крови в процессе их миграции к очагу воспаления, определяя дифференцировку и пути активации макрофагов в тканях.

Цель исследования – оценка иммунофенотипа моноцитов крови и исследование *in vitro* уровня секреции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких.

Методика. Обследовано 65 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких. Материалом исследования служили венозная кровь и мононуклеарные лейкоциты периферической крови. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр Cytotflex, Beckman Coulter, США) в цельной крови с использованием моноклональных антител («eBioscience», США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы «CytExpert 2.0». Определяли количество клеток экспрессирующих поверхностные маркеры: CD14, CD163, CD204 и HLA-DR. Содержание цитокинов (IL-2, IL-10, TGFβ) в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Результаты. Полученные результаты позволяют предположить, что при общем снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов крови у больных туберкулезом легких, независимо от его клинической формы сохраняется высокая экспрессия маркеров активации клеток как по провоспалительному фенотипу М1 (HLA-DR-позитивные моноциты), так и противовоспалительному фенотипу М2 (CD163-позитивные моноциты). При диссеминированной форме заболевания повышается количество противовоспалительных CD204-позитивных моноцитов, предшественников М2-макрофагов, что свидетельствует о доминировании супрессорного типа иммунного ответа. Анализ цитокинового статуса *in vitro* показал, что течение болезни сопровождается угнетением эффекторных иммунных реакций и повышением уровня противовоспалительных цитокинов. Выявленные изменения в равной степени могут быть как причиной, так и следствием дефицита секреции IL-2. Показано также, что уровень секреции медиаторов с супрессорными эффектами (IL-10, TGFβ) меняется в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам: гиперсекреция IL-10 отмечается у больных с инфильтративным лекарственно-чувствительным, а TGFβ – при диссеминированном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких.

Заключение. Особенности дифференциации моноцитов крови у больных туберкулезом легких позволили прийти к заключению, что предшественники макрофагов – моноциты, уже в кровотоке начинают экспрессировать маркеры, характерные для разных по функциям М1- и М2-макрофагов, с поляризацией в направлении М2-иммунофенотипа. Следовательно, при развитии туберкулеза легких реализуются механизмы цитокиновой регуляции, подавляющие активацию врожденного иммунитета, что, возможно, является причиной хронизации воспалительного процесса в легких и формирования иммунодефицита индуцированного *Mycobacterium tuberculosis*.

Ключевые слова: туберкулез легких; клетки; моноцит; макрофаг; цитокины; проточная цитометрия; иммуноферментный анализ; дифференцировка моноцитов

Для цитирования: Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Новицкий В.В., Кононова Т.Е., Чумакова С.П., Патышева М.Р. Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020; 64(4): 79-87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.79-87

Для корреспонденции: Чурина Елена Георгиевна, e-mail: lena1236@yandex.ru

Участие авторов: разработка дизайна исследования, анализ литературы, статистическая обработка результатов исследования и их интерпретация, написание и оформление текста рукописи – Чурина Е.Г.; материально-техническое обеспечение проведения лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание, оформление и перевод текста рукописи – Уразова О.И.; пробоподготовка биоматериала, выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, написание и оформление текста рукописи – Ситникова А.В.; консультирование соавторов по гематологическим аспектам исследования, корректировка текста рукописи – Новицкий В.В.; взаимодействие с пациентами, обеспечение забора биоматериала – Кононова Т.Е.; взаимодействие с пациентами, консультирование соавторов по вопросам пульмонологии – Чумакова С.П.; выполнение методов иммуномагнитной сепарации и проточной цитометрии, консультативная помощь при разработке дизайна исследования – Патышева М.Р. Утверждение окончательной версии статьи – все соавторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт №16.512.11.2046), Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-315-90018, проект №11-04-98057-р_сибирь_a), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (гранты НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7, НШ-2690.2018.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 15.12.2019

Принята в печать 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Churina E.G.^{1,2}, Urazova O.I.^{1,3}, Sitnikova A.V.¹, Novitskiy V.V.^{1,3}, Kononova T.E.¹, Chumakova S.P.¹, Patysheva M.R.^{2,4}

Differentiation of blood monocytes and features of the cytokine status in patients with lung tuberculosis

¹Siberian State Medical University,
Moskovsky Trakt Str. 2, Tomsk, 634050, Russia;

²National Research Tomsk State University,
Prospekt Lenina 36, Tomsk, 634050, Russia;

³Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics,
Prospekt Lenina 40, Tomsk, 634050, Russia;

⁴Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,
5 Kooperativnaya Str., Tomsk, 634009, Russia

In clinical manifestation of pulmonary tuberculosis, alveolar macrophages perform as a reservoir where they accumulate mycobacteria and lose their effector functions due to the pathological conversion of macrophage pro-inflammatory M1 phenotype to the anti-inflammatory M2 phenotype, which provides transition to chronic infection. The study hypothesis suggested that the cytokine status, as evaluated by leukocyte secretion of cytokines *in vitro*, influences the monocyte polarization in the blood during their migration to the inflammatory focus, thereby determining differentiation and pathways of macrophage activation in tissues.

The aim of this work was to assess the immunophenotype of blood monocytes and the *in vitro* secretion of immunoregulatory cytokines by mononuclear peripheral blood leukocytes from patients with different clinical forms of pulmonary tuberculosis taking into account the pathogen sensitivity to major anti-tuberculosis drugs.

Methods. 65 patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis were evaluated. The study material was venous blood and peripheral blood mononuclear leukocytes. Monocyte immunophenotype was determined in whole blood by flow cytometry on a Cytoflex flow cytometer (Bectan Coulter, USA) with monoclonal antibodies (eBioscience, USA). Results were processed with a CytExpert 2.0 software. The number of cells expressing surface markers, CD14, CD163, CD204 and HLA-DR, was determined. Content of cytokines (IL-2, IL-10, TGF β) in supernatants of cell cultures was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results of the study were processed with a SPSS v.11.0 standard software package.

Results. The study results suggested that with an overall decrease in the number of circulating CD14-positive blood monocytes in patients with pulmonary tuberculosis regardless of its clinical form, high expression of cell activation markers remained both for the pro-inflammatory M1 phenotype (HLA-DR-positive monocytes) and the anti-inflammatory M2 phenotype (CD163-positive monocytes). In disseminated tuberculosis, the number of anti-inflammatory CD204-positive monocytes, M2 macrophage precursors, increases indicating predomination of the immunosuppressive response. *In vitro* analysis of the cytokine status showed that tuberculosis progression is accompanied by inhibition of effector immune responses and increases in anti-inflammatory cytokine concentrations *in vitro*. These changes may be equally either a cause or a consequence of deficient IL-2 secretion. We also found that the secretion of mediators with suppressor effects (IL-10, TGF β) varied depending on both the clinical form of tuberculosis and the pathogen sensitivity to anti-TB drugs; IL-10 hypersecretion was observed in patients with drug-sensitive, infiltrative tuberculosis whereas TGF β hypersecretion was observed in disseminated, drug-resistant tuberculosis.

Conclusion. Features of blood monocyte differentiation in patients with pulmonary tuberculosis allowed us to conclude that monocytes, the macrophage precursors, start expressing markers for different functions of M1 and M2 macrophages with polar-

ization toward the M2 immunophenotype already in the bloodstream. Therefore, in the development of pulmonary tuberculosis, cytokine regulation mechanisms become involved in suppressing the activation of innate immunity, which possibly causes chronic inflammation in the lungs and formation of Mtb-induced immunodeficiency.

Keywords: pulmonary tuberculosis; cells; monocyte; macrophage; cytokines; flow cytometry; enzyme immunoassay; monocyte differentiation

For citation: Churina E.G., Urazova O.I., Sitnikova A.V., Novitskiy V.V., Kononova T.E., Chumakova S.P., Patysheva M.R. Differentiation of blood monocytes and features of the cytokine status in patients with lung tuberculosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 79-87. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.79-87

For correspondence: **Elena G. Churina**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Siberian State Medical University, Ministry of Health Care of the Russian Federation; 2 Moskovsky trakt, Tomsk 634050, Russian Federation; Professor, National Research Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation, e-mail: lena1236@yandex.ru

Contribution: research concept and design development, literature analysis, statistical processing of research results and their interpretation, writing and formatting the manuscript text – Churina E.G.; material and technical support for laboratory research, interpretation of results, writing, formatting and translation of the text of the manuscript – Urazova O.I.; sample preparation of biomaterial, implementation of methods of immunomagnetic separation and flow cytometry, writing and formatting the text of the manuscript – Sitnikova A.V.; advising co-authors on the hematological aspects of the study, correcting the text of the manuscript – Novitskiy V.V.; interaction with patients, ensuring the collection of biomaterial – Kononova T.E.; interaction with patients, consulting co-authors on pulmonology – Chumakova S.P.; implementation of methods of immunomagnetic separation and flow cytometry, advisory assistance in the development of research design – Patysheva M.R. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Acknowledgment. The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (State Contract # 16.512.11.2046), Russian Foundation for Basic Research (project #19-315-90018, project # 11-04-98057-r_sibir a), and the Council for Grants of the President of the Russian Federation for Leading Scientific Schools (grants NSh-614.2012.7, NSh-4184.2014.7, NSh-2690.2018.7).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. The materials of the article have not been published anywhere before.

Information about the authors:

Churina E.G., <https://orcid.org/0000-0002-8509-9921>

Urazova O.I., <https://orcid.org/0000-0002-9457-8879>

Sitnikova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5896-1144>

Novitskiy V.V., <https://orcid.org/0000-0002-9577-8370>

Kononova T.E., <http://orcid.org/0000-0001-8457-9440>

Chumakova S.P., <https://orcid.org/0000-0003-3468-6154>

Patysheva M.R., <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>

Received 15.12.2019

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

Введение

Туберкулез (ТБ) – высоко вирулентная и распространенная инфекция. Сегодня, по-прежнему, во всем мире достаточно высокий процент инфицированных *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* людей. При этом имеется тенденция к увеличению среди пациентов частоты встречаемости остро прогрессирующих деструктивных форм туберкулеза с тяжелым клиническим течением заболевания и формированием множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам [1].

Неэффективность механизмов иммунной защиты при внедрении *Mtb* в макроорганизм – ведущий фактор развития туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), так как селекция резистентных штаммов микобактерий определяется активностью иммунного ответа в целом. Ключевые клетки противотуберкулезного иммунитета – макрофаги и

T-лимфоциты [2]. Риск развития туберкулеза возрастает у лиц с первичными или вторичными иммунодефицитами. Высокая частота встречаемости туберкулеза с МЛУ также отмечается у иммунокомпрометированных пациентов [3].

При клинической манифестации ТБ альвеолярные макрофаги играют роль резервуара, в котором накапливаются *Mtb*, и перестают выполнять свои эффекторные функции. Это связано с патологическим переключением их провоспалительного фенотипа М1 на противовоспалительный – М2, что способствует хронизации и персистенции туберкулезной инфекции. Вероятно, что поляризация фенотипа предшественников макрофагов – моноцитов может происходить еще в кровотоке под влиянием комплекса цитокинов и ростовых факторов. Таким образом, при реализации иммунной защиты против *Mtb* пластичность моноци-

тов/макрофагов обеспечивает возможность их конверсии и функционального перепрограммирования [4, 5]. Причины дисбаланса иммунного ответа у больных ТБ разнообразны. Они могут быть связаны с поляризацией иммунных реакций в направлении гуморального и супрессорного типов. Соответственно меняется и цитокиновый профиль с преобладанием цитокинов, подавляющих активацию макрофагов и эффекторных Т-клеток [6].

Научная гипотеза нашего исследования заключалась в том, что цитокиновый статус организма, который мы оценивали, определяя секрецию цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови (МПК) *in vitro*, влияет на предварительную поляризацию моноцитов в крови в процессе их миграции к очагу воспаления, определяя, таким образом, дифференцировку и пути активации макрофагов в тканях.

Учитывая интенсивное развитие иммунобиотерапии и актуальность проблемы резистентности бактерий к антибиотикам, новые знания об особенностях дифференцировки моноцитов и секреции цитокинов при ТБ могут стать фундаментальной основой для разработки перспективных иммуноактивных средств, дополняющих стандартную противотуберкулезную химиотерапию [7].

Цель работы – оценка иммунофенотипа моноцитов крови и исследование уровня секреции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови *in vitro* у больных с различными клиническими формами туберкулеза легких с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к основным противотуберкулезным средствам.

Методика

Работа выполнена по международным правилам работы с биоматериалом людей. Все испытуемые добровольно подписывали форму информированного согласия на анонимное участие в исследовании. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Национального исследовательского Томского государственного университета. Обследовано 65 пациентов с впервые выявленным ТБ легких (45 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 55 лет). Диагноз устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были разделены на 2 группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 37 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) – 28 человек. При делении больных

ТБ на группы учитывалась чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным средствам (ПТС): группу пациентов, выделяющих *Mtb*, чувствительные к основным ПТС, составили 43 человека, во вторую группу были включены 22 пациента, выделяющих *Mtb*, устойчивые к ПТС основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). У 22 пациентов из 65 проводилось исследование иммунофенотипа моноцитов крови. Данная группа представлена в работе только в аспекте разных клинических форм ТБ, поскольку во всей этой группе *Mtb* были чувствительны к ПТС основного ряда: 12 пациентов с инфильтративным ТБ и 10 с диссеминированным ТБ. Контрольную группу составили 15 здоровых доноров с соответствующим группой больных ТБ распределением по полу и возрасту (10 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 55 лет).

Материалом исследования служили венозная кровь и мононуклеары периферической крови. Забор крови проводился утром натощак из локтевой вены до начала проведения химиотерапии ПТС. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии в цельной крови с использованием моноклональных антител («Bioscience», США) на проточном цитофлуориметре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы «CytExpert 2.0». Определяли содержание позитивных клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры моноцитов: CD14, CD163, CD204 и HLA-DR.

Из крови клетки выделяли методом градиентного центрифугирования (1,077 г/см³). Клетки культивировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% инактивированной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицин, 2 ммоль/мл HEPES). Клеточность в суспензионной культуре стандартизировали до $2,5 \times 10^6$ /мл. Для специфической (антигенной) стимуляции клеток в культуре применяли вакцинный штамм BCG (50 мкг/мл). Определяли базальный и стимулированный вакциной уровень секреции следующих цитокинов: интерлейкинов IL-2, IL-10, трансформирующего фактора роста (TGF) β . Содержание цитокинов в супернатантах суспензионных клеточных культур оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Исследование проводили с использованием наборов ООО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург (для измерения концентрации IL-2), ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск (для измерения концентрации IL-10) и «BCM Diagnostics», США (для измерения концентрации TGF- β). Оптическую плотность регистрировали на

анализаторе Multiskan EX (Thermo electron corporation, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS v.11.0. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка. Так как распределение выборок отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили [Q₁, Q₃]. Для оценки статистической значимости различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали U-критерий Манна–Уитни и T-критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия поверхностных маркеров моноцитов (табл. 1). Анализ экспрессии поверхностных маркеров моноцитов показал снижение численности CD14⁺-клеток у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ по сравнению с группой здоровых доноров. Количество CD14⁺-моноцитов с экспрессией молекулы CD204 при диссеминированном ТБ было выше, чем в контрольной группе, а при инфильтративном ТБ не отличалось от такового у здоровых добровольцев (табл. 1). Анализ экспрессии на моноцитах молекул HLA-DR и CD163 у больных диссеминированным ТБ выявил значимое повышение числа позитивных клеток по сравнению с группой здоровых доноров. Сходная картина прослеживалась у больных инфильтративным ТБ: содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, в этой группе пациентов было также значительно выше, чем в контроле (табл. 1). Вместе с тем статистически значимых межгрупповых различий ис-

следуемых показателей у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ не было выявлено.

Секреция цитокинов (табл. 2). Оценивая уровень секреции IL-2 – профильного медиатора Т-хелперов типа 1 (Th1), было установлено, что до начала лечения ПТС у больных с лекарственно-чувствительным ТБ (ЛЧТБ) (за исключением больных с диссеминированным и лекарственно-устойчивым ТБ (ЛУТБ) базальный уровень секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови был ниже, чем у здоровых доноров. При этом наиболее выраженное снижение секреции медиатора отмечалось у больных с лекарственно-устойчивым вариантом ДТБ (табл. 2).

При стимуляции мононуклеаров вакцинным штаммом VCG секреция IL-2 оказалась существенно ниже нормы вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя и формы ТБ. При инфильтративном ЛУТБ индуцированная секреция IL-2 была в 2 раза выше (табл. 2).

При изучении секреции цитокинов, продуцируемых Т-хелперами типа 2 (Th2) и регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), нами были выявлены следующие закономерности. У больных с инфильтративным ЛЧТБ было зарегистрировано статистически значимое (в 1,78 раза относительно контрольных значений) увеличение базальной секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами крови (табл. 3). Уровень спонтанной секреции TGF-β при лекарственно-чувствительном ТБ оставался в пределах нормы. В то же время при лекарственно-устойчивом ИТБ имелось снижение секреции TGF-β, а при диссеминированном ЛУТБ – ее увеличение в 1,5 раза. Установлено, что у больных с лекарственно-устойчивым ИТБ дан-

Таблица 1

Содержание CD14⁺-клеток, экспрессирующих молекулы CD204, HLA-DR CD163 у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me [Q₁–Q₃]

Группы обследованных лиц	CD14 ⁺ -клетки, %	CD14 ⁺ CD204 ⁺ -клетки, %	CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ -клетки, %	CD14 ⁺ CD163 ⁺ -клетки, %
Здоровые доноры	80.0 [73.3–86.3]	2.6 [1.32–3.90]	22.9 [18.4–29.3]	17.7 [12.3–22.0]
Больные ИТБ	55.6 [42.5–66.0] $p_1=0.027$	2.8 [1.46–3.72]	59.6 [46.7–65.0] $p_1=0.031$	45.6 [37.7–53.6] $p_1=0.027$
Больные ДТБ	65.2 [50.7–74.0] $p_1=0.012$	5.5 [3.22–6.70] $p_1=0.007$ $p_2=0.011$	67.5 [54.5–71.0] $p_1=0.010$	41.5 [34.3–48.6] $p_1=0.012$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных ИТБ.

ный показатель был в 2,9 раза ниже, чем у больных с ДТБ (табл. 3).

Добавление в культуры клеток вакцинного штамма BCG (табл. 3) сопровождалось повышением уровня секреции IL-10 у больных с инфильтративным ЛЧТБ относительно нормы и базального уровня секре-

ции. Более высоким в условиях антигенной индукции клеток оказался также уровень секреции IL-10 при диссеминированном ЛУТБ (в сравнении со спонтанным уровнем образования цитокина). При инфильтративном ЛУТБ уровень стимулированной секреции IL-10 оставался в пределах нормы (табл. 3).

Таблица 2

Показатели секреции IL-2 *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам, Ме [Q₁-Q₃]

IL-2 (пг/мл)	Группы обследованных лиц				
	Здоровые доноры	Больные с ЛЧТБ		Больные с ЛУТБ	
		Больные ИТБ	Больные ДТБ	Больные ИТБ	Больные ДТБ
Без индукции (базальная)	22.26 [10.82–30.18]	16.24 [9.63–32.48] $p_1=0.002$	29.72 [12.72–53.59] $p_2=0.049$	15.42 [10.28–20.73] $p_1=0.037$	14.32 [9.73–21.49] $p_1=0.048$ $p_3=0.042$
При индукции BCG	69.36 [13.94–65.80]	13.82 [5.28–30.21] $p_1=0.016$	27.18 [11.33–42.86] $p_1=0.003$	26.83 [11.15–33.32] $p_1=0.038$ $p_3=0.024$	15.53 [9.79–22.85] $p_1=0.018$ $p_2=0.019$

Примечание. p_3 – у больных с ЛЧТБ.

Таблица 3

Показатели секреции IL-10 и TGF- β *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам, Ме [Q₁-Q₃]

Группы обследованных лиц		IL-10 (пг/мл)		TGF- β (пг/мл)	
		Без индукции (базальная)	При индукции BCG	Без индукции (базальная)	При индукции BCG
Здоровые доноры		25.29 [13.50–33.56]	26.21 [22.74–52.20]	1108,75 [929.80–1487.20]	1087.80 [500.00–1412.60]
Больные с ЛЧТБ	Больные ИТБ	44.92 [18.75–57.64] $p_1=0.002$	55.49 32.22–65.28) $p_1=0.027$ $p_4=0.005$	1062.91 [792.24–1613.57]	1125.92 [875.16–1215.07]
	Больные ДТБ	24.11 [9.54–50.72] $p_2<0.001$	33.52 20.64–66.17) $p_2<0.001$	923.62 [728.24–1427.19]	673.18 [573.18–831.92] $p_1<0.001$ $p_2=0.003$ $p_4=0.038$
Больные с ЛУТБ	Больные ИТБ	27.51 [24.18–42.71] $p_3<0.001$	24.51 25.62–53.21	578.02 [315.29–781.46] $p_{1,3}<0.001$	352.17 [195.32–891.45] $p_1=0.021$ $p_3=0.004$
	Больные ДТБ	20.07 [18.22–21.13]	26.52 23.57–35.24 $p_2=0.042$ $p_4=0.004$	1672.33 [915.61–2452.27] $p_{1,2}<0.001$ $p_3=0.005$	1986.58 [792.53–3009.68] $p_1=0.044$ $p_2=0.048$ $p_3=0.023$ $p_4=0.007$

Примечание. p_4 – с базальным уровнем секреции цитокина.

Уровень BCG-индуцированной секреции TGF- β при диссеминированном ЛЧТБ оказался в 1,6 раза ниже, чем у здоровых доноров, и в 1,4 раза ниже, чем в отсутствие дополнительной антигенной нагрузки. При ЛУТБ установлены разнонаправленные изменения секреции TGF- β в зависимости от его клинической формы. Так, при ИТБ секреция TGF- β была в 3,1 раза ниже относительно контрольных значений, а при ДТБ отмечалось ее увеличение как относительно контрольных значений (в 1,8 раза), так и сравнительно с базальным уровнем (в 1,2 раза) (табл. 3).

Обсуждение

Высокая эффективность активации врожденного иммунитета при ТБ играет решающую роль в развитии и исходах туберкулезной инфекции. Нарушения индуктивной фазы иммунного ответа часто связаны с формированием толерантности к антигену уже на стадии его презентации. Полученные результаты позволяют предположить, что при общем снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов крови у больных ТБ независимо от его клинической формы сохраняется высокая экспрессия маркеров активации клеток как по провоспалительному фенотипу M1 (HLA-DR-позитивные моноциты), так и противовоспалительному фенотипу M2 (CD163-позитивные моноциты) (табл. 1). Вероятно, механизмы их окончательной дифференцировки определяются непосредственно в очаге воспаления. В то же время, повышение числа CD204-позитивных моноцитов (табл. 1), предшественников M2-макрофагов, у больных диссеминированным ТБ свидетельствует о доминировании супрессорного типа иммунного ответа. Высокая экспрессия скавенджер-рецептора CD204 на моноцитах также может быть связана с предрасположенностью данных пациентов к реализации, в первую очередь, регенераторных и противовоспалительных функций клеток врожденного иммунитета.

Манифестация туберкулезной инфекции контролируется различными факторами, участвующими в формировании не только врожденного, но и адаптивного иммунитета, в котором существенная роль отводится как макрофагам, так и Т-лимфоцитам, взаимно активирующимся посредством цитокинов в ответ на индукцию антигеном *Mtb* [8]. Ключевую роль в противотуберкулезном иммунитете играет IL-2 – ростовой фактор Т-клеток. Он обеспечивает в ходе иммунного ответа активацию регуляторных Т-клеток и эффекторных (воспалительных и цитотоксических) Т-лимфоцитов [9].

Исследование *in vitro* IL-2-секреторной функции мононуклеарных лейкоцитов крови показало, что в

группе больных с диссеминированным ЛУТБ дефицит секреции IL-2 был более выраженным, чем при диссеминированном ЛЧТБ (табл. 2). Выявленное нами у больных ТБ снижение секреции IL-2 в период активно развивающегося патологического процесса, вероятно, определяется непосредственным токсическим влиянием продуктов жизнедеятельности *Mtb* на процессы биосинтеза цитокина в иммунокомпетентных клетках [10]. Кроме того, в основе иммунодепрессии при ТБ лежит функциональная анергия Т-клеток, одним из проявлений которой является гипосекреция IL-2, что опосредует развитие лимфоцитопении и способствует тяжелому клиническому течению заболевания при ЛУТБ [11]. Уровень BCG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* при ЛЧТБ и ЛУТБ оказался ниже, чем в контрольной группе, у всех больных ТБ независимо от чувствительности возбудителя к ПТС (табл. 2).

Известно, что IL-2 – ведущий митогенный фактор Т-клеток. При этом он также стимулирует рост и дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов с супрессорной активностью [12]. В наших предыдущих работах было установлено, что при ТБ в крови больных значительно повышается содержание Treg, в том числе их субпопуляций с супрессорной активностью, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3 [13]. Доказано, что первичный механизм действия регуляторных Т-лимфоцитов представляет собой дезорганизацию процессов метаболизма. В результате наличия поверхностной молекулы CD25 (α -цепь рецептора к IL-2) Treg могут связывать IL-2, тем самым препятствуя активации данным цитокином других Т-клеток и секреции ими IL-2 и других провоспалительных медиаторов [14]. Возможно, снижение секреции IL-2 при ТБ вызвано повышением численности и функциональной активности Treg-лимфоцитов.

IL-10 подавляет синтез и секрецию регуляторных цитокинов всеми клонами Т-лимфоцитов-хелперов, а также блокирует активацию антигенпрезентирующих клеток (АПК). Медиатор обладает выраженным иммуносупрессорным эффектом и снижает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на *Mtb* при туберкулезе [15]. Мы установили, что при лекарственно-чувствительном ИТБ возрастает уровень базальной и BCG-стимулированной секреции IL-10 *in vitro* (табл. 3).

При инфильтративной форме ТБ, как правило, отмечается наименьшая степень отклонений показателей иммунитета, что согласуется с меньшей выраженностью клинико-рентгенологических проявлений заболевания по сравнению с другими формами туберкулеза. В случае развития ИТБ клеточные механизмы защиты работают относительно эффективно, сохраняется се-

клеточная активность иммунокомпетентных клеток в отношении цитокинов Th1-профиля (IL-12, интерферон (IFN) γ) [16].

Основными клетками-продуцентами другого иммуносупрессорного цитокина – TGF- β – являются Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Однако его секретируют (но в меньшем количестве) и иные клетки – Th2-лимфоциты, моноциты/макрофаги, эозинофилы, тромбоциты, хондроциты, остеобласты и остеокласты [17]. Главным свойством TGF- β является супрессия всех типов иммунных реакций, но, в первую очередь, Th1-адаптивного ответа [18]. Под влиянием TGF- β происходит конверсия субпопуляций Т-клеток – из CD4⁺CD25⁻Т-лимфоцитов образуются CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg [19].

Проявлением такого рода преобразования является экспрессия транскрипционного фактора Foxp3 (скурфина) непосредственно в клетке и молекул CD25 и CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) на ее поверхности. Известно, что TGF- β может изменять функциональную активность Treg и их чувствительность к апоптозу за счет повышения экспрессии гена *FOXP3*, который локализуется в X-хромосоме [18].

Анализ секреции TGF- β в культуре МПК *in vitro* показал наличие разнонаправленных ее изменений у больных ТБ (табл. 3). У пациентов с ДТБ с лекарственной устойчивостью возбудителя отмечалось значительное увеличение секреции данного медиатора (базальной и BCG-индуцированной), тогда как при ИТБ секреция цитокина снижалась. Ниже нормы уровень секреции TGF- β оказался также при индукции клеток вакцинным штаммом BCG при лекарственно-чувствительном ДТБ (табл. 3).

Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что у больных ИТБ ведущим медиатором, способствующим поляризации иммунных реакций в направлении супрессорного пути, 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* [20]. Поскольку у пациентов с диссеминированным ЛУТБ секреция TGF- β возрастала в ответ на индукцию суспензионной культуры клеток BCG, можно судить о высокой реактивности МПК при этой клинической форме болезни. В сочетании с высокой экспрессией ключевого маркера M2-макрофагов – скавенджер-рецептора CD204 на моноцитах у больных диссеминированным ТБ, гиперсекреция TGF- β – безусловно, негативный фактор, поскольку предрасполагает к дифференцировке и активации моноцитов по альтернативному пути M2, фиброгенезу и затяжному течению воспаления [21].

Заключение

Сегодня, в период ренессанса врожденного иммунитета, углубленного изучения механизмов действия моноцитов/макрофагов при инфекционной и неинфекционной патологии, уже не вызывает сомнений лидирующая роль этих клеток в иммунном ответе, которая и определяет результат его эффекторной фазы.

Определение иммунофенотипа моноцитов крови у больных ТБ показало, что предшественники макрофагов уже в кровотоке начинают экспрессировать маркеры, характерные для разных по функциям M1- и M2-макрофагов, то есть делятся на 2 основные субпопуляции. Интересно, что при диссеминированной форме ТБ значительно повышается численность CD204-позитивных моноцитов. Таким образом, представляется изначально детерминированным именно M2-путь активации макрофагов.

Исследование цитокинового статуса у больных ТБ позволяет прийти к заключению, что, в целом, течение болезни сопровождается угнетением эффекторных иммунных реакций. Выявленные изменения в равной степени могут быть как причиной, так и следствием дефицита синтеза и секреции IL-2. Уровень секреции медиаторов с супрессорными эффектами (IL-10, TGF- β) варьирует в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности *Mtb* к ПТС. Так, базальная и антиген-индуцированная *in vitro* гиперсекреция IL-10 отмечается у больных с инфильтративным ЛЧТБ, а TGF- β – при диссеминированном ЛУТБ.

Следовательно, при развитии ТБ доминируют механизмы цитокиновой регуляции, подавляющие активацию иммунного ответа, что, возможно, является причиной хронического воспаления в ткани легких и формирования вторичного иммунодефицита, индуцированного *Mtb*.

Литература

(п.п. 1-12; 14-21 см. References)

13. Кононова Т.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Колобовникова Ю.В., Чурина Е.Г., Захарова П.А. Факторы дифференцировки Th17- и Treg-лимфоцитов при туберкулезе легких. *Бюлл. экп. биол. и мед.* 2015; 159(2): 158–61. Doi: 10.1007/s10517-015-2922-9. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2922-9>

References

1. Dye C., Williams B.G. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*. 2010; 328: 856–61. Doi: 10.1126/science.1185449. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466923>
2. Mihret A. The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence*. 2012; 3(7): 654–59. Doi: 10.4161/viru.22586. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3545947/>

3. Bozzano F., Marras F., De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2014; 6(1): e2014027. Doi: 10.4084/MJHID.2014.027. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804000>
4. Castaño D., García L.F., Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2011; 91(5): 348–60. Doi: 10.1016/j.tube.2011.04.002.
5. Balboa L., Romero M.M., Basile J.I., Sabio y García C.A., Schierloh P., et al. Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90(1): 69–75. Doi: 10.1189/jlb.1010577. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454357>
6. Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonov M.A., Nikonov S.D., Ostantin A.A., Chernykh E.R. Impairments of Antigen-Presenting Cells in Pulmonary Tuberculosis. *J. Immunol. Res.* 2015; Article ID 793292. Doi.org/10.1155/2015/793292. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/793292/>
7. Tiemersma E., van den Hof S., Dravniece G., Wares F., Molla Y., Permata Y., et al. Integration of drug safety monitoring in tuberculosis treatment programmes: country experiences. *Eur. Respir. Rev.* 2019; 28(153): 180115. Doi: 10.1183/16000617.0115-2018. <https://err.ersjournals.com/content/28/153/180115>
8. Chiacchio T., Petruccioli E., Vanini V., Cuzzi G., La Manna M.P., Orlando V. Pinnetti C., et al. Impact of antiretroviral and tuberculosis therapies on CD4+ and CD8+ HIV/M. tuberculosis-specific T-cell in co-infected subjects. *Immunol. Lett.* 2018; 198: 33–43. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307796/>
9. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* 2016; 17(11): 1322–33. Doi: 10.1038/ni.3540. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27595233>
10. Balcells M.E., Ruiz-Tagle C., Tiznado C., García P., Naves R. Diagnostic performance of GM-CSF and IL-2 in response to long-term specific-antigen cell stimulation in patients with active and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2018; 112: 110–19. Doi: 10.1016/j.tube.2018.08.006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30205963>
11. Biselli R., Mariotti S., Sargentini V., Sauzullo I., Lastilla M., Mengoni F., et al. Detection of interleukin-2 in addition to interferon- γ discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16: 1282–84.
12. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Moon J.J., Chu H.H., Lio C.W., et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity.* 2008; 28: 112–21. Doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886902>
13. Kononova T.E., Urazova O.I., Novitskii V.V., Kolobovnikova Yu.V., Churina E.G., Zakharova P.A. Factors of Th17 and Treg Lymphocyte Differentiation in Pulmonary Tuberculosis. *Bull. Exp. Biol. Med. (Mosk.)*. 2015; 159(2): 158–61. (In Russian) Doi: 10.1007/s10517-015-2922-9 <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2922-9>
14. Whiteside T.L. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2018; 22(4): 353–63. Doi: 10.1080/14728222.2018.1451514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29532697>
15. Mannino M.H., Zhu Z., Xiao H., Bai Q., Wakefield M.R., Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2015; 367(2): 103–07. Doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26188281>
16. Pai M., Denking C.M., Kik S. V., Rangaka M.X., Zwerling A., Oxlade O., et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 3–20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396134>
17. Rudra D., Egawa T., Chong M.M., Treuting P., Littman D.R., Rudensky A.Y. Runx-CBF beta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 1170–77. Doi: 10.1038/ni.1795. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767756>
18. Zhang J., Li H., Yi D., Lai C., Wang H., Zou W., et al. Knockdown of vascular cell adhesion molecule 1 impedes transforming growth factor beta 1-mediated proliferation, migration, and invasion of endometriotic cyst stromal cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2019; 17: 69. Doi.org/10.1186/s12958-019-0512-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31443713>
19. Kondělková K., Vokurková D., Krejsek J., Borská L., Fiala Z., Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010; 53(2): 73–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20672742>
20. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The Role of Foxp3-Expressing Regulatory T Cells and T Helpers in Immunopathogenesis of Multidrug Resistant Pulmonary Tuberculosis. *Tuberc. Res. Treat.* 2012; 2012: 931291. Doi: 10.1155/2012/931291. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359675/>
21. 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

Сведения об авторах:

Чурина Елена Георгиевна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, проф. каф. органической химии, вед. науч. сотр. лаб. трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, e-mail: lena1236@yandex.ru;

Уразова Ольга Ивановна, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии, проф. каф. комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, e-mail: urazova72@yandex.ru;

Ситникова Анжелика Владимировна, аспирант каф. патофизиологии, e-mail: anjelika.sitnikova@yandex.ru;

Новицкий Вячеслав Викторович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, заслуженный деятель науки РФ, проф. каф. патофизиологии, проф. каф. комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, e-mail: kaf.pat.fiziolog@ssmu.ru;

Кононова Татьяна Евгеньевна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: kononova.te@gmail.com;

Чумакова Светлана Петровна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, e-mail: Chumakova_S@mail.ru;

Патышева Марина Ринатовна, мл. науч. сотр. лаб. биологии опухолевой прогрессии, мл. науч. сотр. лаб. трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, e-mail: marinapatysh@gmail.com