

Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких

Чурина Е.Г.^{1,2}, Ситникова А.В.¹, Уразова О.И.^{1,3}, Патышева М.Р.^{2,4}, Новицкий В.В.^{1,3}, Голубчиков П.Н.⁵, Степанова Е.П.⁵

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

⁴ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

⁵ Томский фтизиопульмонологический медицинский центр
634009, г. Томск, ул. Р. Люксембург, 17

РЕЗЮМЕ

Цель работы – установить особенности экспрессии провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным лекарственным средствам.

Материалы и методы. Обследованы 40 пациентов (36 мужчин и 4 женщины): 18 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) (16 мужчин и 2 женщины, средний возраст (44,56 ± 8,10) лет) и 22 пациента с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) (20 мужчин и 2 женщины, средний возраст (46,54 ± 5,24) лет) с туберкулезом легких (ТБ). Из них было 30 пациентов, выделяющих *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), чувствительные к основным противотуберкулезным средствам (ПТС), и 10 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к лекарственным средствам основного ряда противотуберкулезной терапии. Группу сравнения составили 15 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом исследования являлась венозная кровь. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью их трансформации в макрофаги использовали метод центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,077 г/см³ с последующей иммуномагнитной сепарацией CD14⁺ клеток. Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10 с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) (5 нг/мл) в концентрации 1 × 10⁶ клеток/мл со стимуляторами: интерлейкином (IL) 4 (10 нг/мл) и интерфероном (IFN) γ (100 нг/мл). Иммунофенотипирование макрофагов проводили с использованием моноклональных антител к CD80, CD86, HLA-DR на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX LX (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США). Полученные результаты анализировали статистическими методами.

Результаты. Количество интактных и стимулированных цитокинами (IL-4 и IFNγ) CD80-позитивных макрофагов у больных ИТБ и с лекарственно-устойчивым ТБ (ЛУ ТБ) превышало их число не только у здоровых доноров, но и у больных ДТБ и с лекарственно-чувствительным ТБ (ЛЧ ТБ) соответственно. Кроме того, у больных ИТБ и ЛУ ТБ регистрировалось повышение экспрессии CD86 на макрофагах после добавления в

✉ Чурина Елена Георгиевна, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

суспензионную культуру IFN γ (индуктор M1-активации). У больных ДТБ и ЛЧ ТБ количество макрофагов с экспрессией костимулирующих молекул семейства B7 при индукции цитокинами, напротив, снижалось или сохранялось в пределах нормы в отсутствие реакции на цитокины. Дефицит HLA-DR-позитивных макрофагов обнаруживался у всех больных ТБ. Минимальное число макрофагов, экспрессирующих HLA-DR, установлено у больных ДТБ и ЛЧ ТБ после инкубации клеток с IL-4 (индуктор M2-активации).

Заключение. Оценка экспрессии мембранных молекул B7 (CD80/86) и HLA-DR на макрофагах у больных ТБ позволяет сделать вывод о нарушениях противотуберкулезного иммунного ответа на стадии презентации антигена (у всех обследованных больных ТБ) и 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 свидетельствует о повышении реактивности клеток при данных формах течения ТБ. Наряду с этим дефицит экспрессии на макрофагах HLA-DR (ключевого маркера провоспалительной активации клеток) при ТБ можно рассматривать как общий (не зависящий от клинической формы болезни и лекарственной чувствительности возбудителя) патогенетический фактор иммунного дисбаланса при туберкулезе легких.

Ключевые слова: макрофаги, туберкулез легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ, костимулирующие молекулы, IL-4, IFN γ , CD80, CD86, HLA-DR.

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

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

Соответствие принципам этики. Пациенты подписали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 5648 от 27.11.2017).

Для цитирования: Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Новицкий В.В., Голубчиков П.Н., Степанова Е.П. Экспрессия провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 179–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-179-188>.

Expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis

Churina E.G.^{1,2}, Sitnikova A.V.¹, Urazova O.I.^{1,2}, Novitskiy V.V.^{1,2}, Patysheva M.R.^{2,4}, Golubchikov P.N.⁵, Stepanova E.P.⁵

¹ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University
36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics
40, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

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

⁵ Tomsk Phthisiopulmonological Medical Center
17/1, R. Luksemburg Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this study was to identify features of the expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis, depending on the clinical form of the disease and sensitivity of the pathogen to anti-TB drugs.

Materials and methods. 40 patients (36 men and 4 women) with pulmonary tuberculosis (TB) were examined: 18 patients (16 men and 2 women, average age (44.56 \pm 8.10) years) with disseminated tuberculosis (DTB) and

22 patients (20 men and 2 women, average age (46.54 ± 5.24) years) with infiltrative tuberculosis (ITB). Of those, 30 patients secreted *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) sensitive to the basic anti-TB drugs (ATBD), and 10 patients secreted MBT resistant to first-line anti-TB drugs. Venous blood was the study material. To isolate monocytes from the whole blood in order to transform them into macrophages, ficoll density gradient centrifugation with gradient density of 1.077 g/cm^3 was used followed by immunomagnetic separation of CD14^+ cells. Monocytes were cultured in a complete culture medium X-VIVO 10 with gentamicin and phenol red with the addition of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (5 ng/ml) at a concentration of 1×10^6 cells/ml with the following stimulators: interleukin (IL) 4 (10 ng/ml) and interferon (IFN) γ (100 ng/ml). Immunophenotyping of macrophages was performed using monoclonal antibodies to CD80, CD86, and HLA-DR on a Beckman Coulter CytoFLEX LX flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The analysis of the obtained data was carried out using the CytExpert 2.0 software application. The results were analyzed using statistical methods.

Results. The number of intact and cytokine-stimulated (IL-4 and IFN γ) CD80-positive macrophages in patients with ITB and drug-resistant TB (DR TB) exceeded their number not only in healthy donors, but also in patients with DTB and drug-sensitive TB (DS TB), respectively. In addition, an increase in CD86 expression on the surface of macrophages was registered in patients with ITB and DR TB after adding IFN γ (M1-activation inducer) to the suspension culture. In contrast, in patients with DTB and DS TB, the number of macrophages with expression of B7 family co-stimulating molecules decreased or remained within the normal values in the absence of a reaction to cytokines during cytokine induction. Deficiency of HLA-DR-positive macrophages was found in all TB patients. The minimal number of macrophages expressing HLA-DR was found in patients with DTB and DS TB after cell incubation with IL-4 (M2-activation inducer).

Conclusion. Evaluation of the expression of B7 (CD80/86) and HLA-DR membrane molecules on macrophages in TB patients allows to conclude that anti-TB immune response is impaired at stages of antigen presentation (in all examined patients with TB) and co-stimulation (in DTB and DS TB). An increase in the expression of macrophage surface molecules CD80 (with M1- and M2-stimulation) and CD86 (with M1-stimulation) in patients with ITB and DR TB indicates an increase in cell reactivity in these forms of TB. In addition, deficit of expression of HLA-DR (a key marker of pro-inflammatory cell activation) on the surface of macrophages in TB can be considered as a general (independent of the clinical form of the disease and drug sensitivity of the pathogen) pathogenetic factor of immune imbalance in pulmonary tuberculosis.

Key words: macrophages, pulmonary tuberculosis, innate immunity, immune response, co-stimulating molecules, IL-4, IFN γ , CD80, CD86, HLA-DR.

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

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

Conformity with the principles of ethics. All patients participating in the study signed an informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee at SSMU (Protocol No. 5648 of 27.11.2017).

For citation: Churina E.G., Sitnikova A.V., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Patysheva M.R., Golubchikov P.N., Stepanova E.P. Expression of pro-inflammatory and co-stimulatory molecules on the surface of macrophages *in vitro* in patients with pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 179–188. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-179-188>.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что иммунитет – это комплекс факторов жизнедеятельности организма, направленных на сохранение его гомеостаза. Приобретенная резистентность к туберкулезу является продуктом сложных иммунных реакций с участием макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов и гранулоцитов. В то же время макрофаги и лимфатическая система человека служат «филогенетической колыбелью» возбудителя туберкулезной инфекции, способству-

ют возникновению симбионтных отношений микобактерий туберкулеза с организмом хозяина [1]. Очевидно, что макрофаги играют ключевую роль в успешной реализации механизмов врожденной иммунной защиты при проникновении патогенов, в том числе и *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), в слизистые оболочки дыхательных путей.

Макрофаги – самые древние иммунокомпетентные клетки. Они представляют собой гетерогенную популяцию резидентных профессиональных антигенпрезентирующих клеток. Макрофаг – главная

эффektorная клетка в защите хозяина от патогенов и регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций. Макрофаги участвуют в ремоделировании и репарации поврежденных тканей [2, 3]. Феномен универсальности и пластичности макрофагов обеспечивает возможность быстрой конверсии их функционального фенотипа в очаге воспаления. Такая гетерогенность определяется способностью макрофагов реализовывать разные программы активации в ответ на различные стимулы: цитокиновые сигналы и сигналы, связанные с повреждением клетки или проникновением в организм паттернов патогенности (DAMPs/РАМРs). При классической активации макрофаги поддерживают течение острого воспалительного Th1-зависимого иммунного ответа, одновременно осуществляя эффекторную функцию (M1-активация). При альтернативной активации макрофаги приобретают противовоспалительный фенотип, в результате чего происходит их функциональная перестройка, и они начинают выполнять толерогенную функцию, способствуя фиброгенезу и усиленной пролиферации клеток (M2-активация) [4, 5].

«Классическая» активация макрофагов, приводящая к поляризации их созревания в направлении M1-клеток, индуцируется интерфероном (IFN) γ , продуцируемым Т-хелперами типа 1 (Th1) и натуральными киллерами (NK), а также фактором некроза опухоли (TNF) α и бактериальным липополисахаридом (LPS) [6]. Основные факторы дифференцировки альтернативно-активированных M2-макрофагов – интерлейкины (IL) 4 и 10 [7, 8]. Толл-подобные рецепторы (TLR) на поверхности и внутри макрофагов распознают паттерны патогенности и, таким образом, запускают процесс активации врожденного иммунитета. Функционально важную группу поверхностных молекул макрофагов образуют молекулы главного комплекса гистосовместимости MHC (HLA-DR) и костимулирующие молекулы группы B7. Экспрессия молекул MHC-II усиливается при активации клеток, в роли костимулирующих выступают молекулы CD80 и CD86. Первая из них появляется на поверхности макрофага только после активации, вторая экспрессируется конститутивно, но при индукции антигеном интенсивность экспрессии усиливается [9–11].

Воспаление – главный эффекторный механизм врожденного иммунитета, который реализуется в легких в ответ на проникновение *M. tuberculosis* в альвеолярные макрофаги. Это происходит, если макрофаги по какой-либо причине не осуществили полноценную фагоцитарную функцию. Эффективность воспалительно-регенераторного потенциала макрофагов определяется, прежде всего, их функци-

ональным фенотипом и интенсивностью экспрессии на клетках провоспалительных молекул.

Таким образом, целью работы явилось установление особенностей экспрессии провоспалительных и костимулирующих молекул на макрофагах *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы обследованы 40 пациентов (36 мужчин и 4 женщины): 18 пациентов с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) (16 мужчин и 2 женщины, средний возраст $(44,56 \pm 8,10)$ лет) и 22 пациента с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) (20 мужчин и 2 женщины, средний возраст $(46,54 \pm 5,24)$ лет). Диагноз устанавливался на основании анамнеза, клинической картины заболевания, а также результатов рентгенологического исследования легких, бактериологического и микроскопического исследования мокроты.

У всех обследованных больных ТБ была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным ПТС. По данному критерию выявлены 30 пациентов, выделяющих МВТ, чувствительные к основным ПТС, и 10 пациентов, выделяющих МВТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). Критериями исключения больных ТБ из исследования являлись возраст младше 20 и старше 55 лет, наличие аллергии, тяжелых сопутствующих заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза. Группы сравнения составили 15 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных туберкулезом легких. Забор крови осуществлялся однократно, до начала курса противотуберкулезной химиотерапии, в момент разгара заболевания. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью последующей их трансформации в макрофаги применяли метод магнитной сепарации CD14⁺ моноцитов (MACS MultiStand, Германия) согласно инструкции производителя Monocytes isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Германия).

Цельную венозную кровь в количестве 20 мл забирали в вакуумные системы с антикоагулянтом (K₃-ЭДТА). Кровь разводили 1 : 1 PBS (фосфатно-солевым буфером) и наслаивали на 15 мл фиколла с плотностью 1,077 г/см³. Образцы центрифугировали 30 мин при 0,016 g. Полученную мононуклеарную фракцию собирали и 2 раза отмывали PBS. После этого добавляли 5 мл PBS, перемешивали, затем под-

считывали 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%-й азид) и CD14⁺ магнитных частиц (Micro Beads, Германия), инкубировали 40 мин. Полученная суспензия подвергалась позитивной магнитной сепарации по протоколу компании (Miltenyi Biotec, Германия).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ IN VITRO

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

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ

Фенотипирование макрофагов проводили на 6-е сут культивирования. Для сбора клеток плашку с культурой клеток помещали на лед и выдерживали 10 мин, затем с помощью клеточного скребка (Cellscaper, США) собирали клетки. Для иммунофено-

типирования макрофагов добавляли моноклональные антитела к CD80, CD86, HLA-DR (eBioscience, США). Измерение образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США).

Для статистического анализа полученных результатов использовали программы SPSS Statistics 17.0 и Microsoft Excel. Данные представляли в виде $Me (Q_1-Q_3)$, где Me – медиана, Q_1-Q_3 – интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиля). Для выполнения сравнительного анализа применяли непараметрический критерий Манна – Уитни с введением поправки Бенджамини – Хохберга. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении экспрессии костимулирующих молекул B7 (CD80/86) и маркера активации HLA-DR на поверхности макрофагов было обнаружено, что количество макрофагов с экспрессией молекулы CD80 у больных ИТБ выше, чем в группе контроля и у больных ДТБ (табл. 1, рис. 1). У больных ДТБ оно было ниже, чем у здоровых доноров. Добавление в культуру клеток IFN γ у больных ИТБ сопровождалось увеличением экспрессии CD80, а внесение в культуру IL-4, напротив, ее снижением по сравнению со значением показателя в отсутствие стимуляции. При ДТБ уровень цитокин-индуцированной экспрессии CD80 существенно не отличался от нормы, но в отсутствие стимуляции был существенно ниже, чем у здоровых доноров.

Таблица 1

Экспрессия провоспалительных маркеров на макрофагах в зависимости от клинической формы заболевания у больных ТБ, %, $Me (Q_1-Q_3)$				
Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD80	Здоровые доноры	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ДТБ	12,23 (8,42–25,13) $p_1 = 0,012$	11,65 (8,01–26,13)	18,70 (9,34–28,27)
	Больные ИТБ	48,60 (24,17–51,14) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,022$	41,61 (20,15–53,23) $p_1 = 0,015$ $p_2 = 0,031$	58,50 (28,73–70,35) $p_1 = 0,021$ $p_2 = 0,012$ $p_4 = 0,014$
CD86	Здоровые доноры	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 ДТБ	14,14 (9,37–21,52)	13,48 (4,73–19,04) $p_1 = 0,012$	15,52 (7,14–25,37) $p_1 = 0,013$

Окончание табл. 1

Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD86	Больные ИТБ	16,54 (9,22–27,63)	19,12 (8,56–23,14) $p_1 = 0,021$	27,02 (15,23–39,14) $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,015$ $p_4 = 0,034$
	Здоровые доноры	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
HLA-DR	Больные ДТБ	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) $p_1 = 0,017$ $p_4 = 0,014$
	Больные ИТБ	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) $p_1 = 0,024$

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

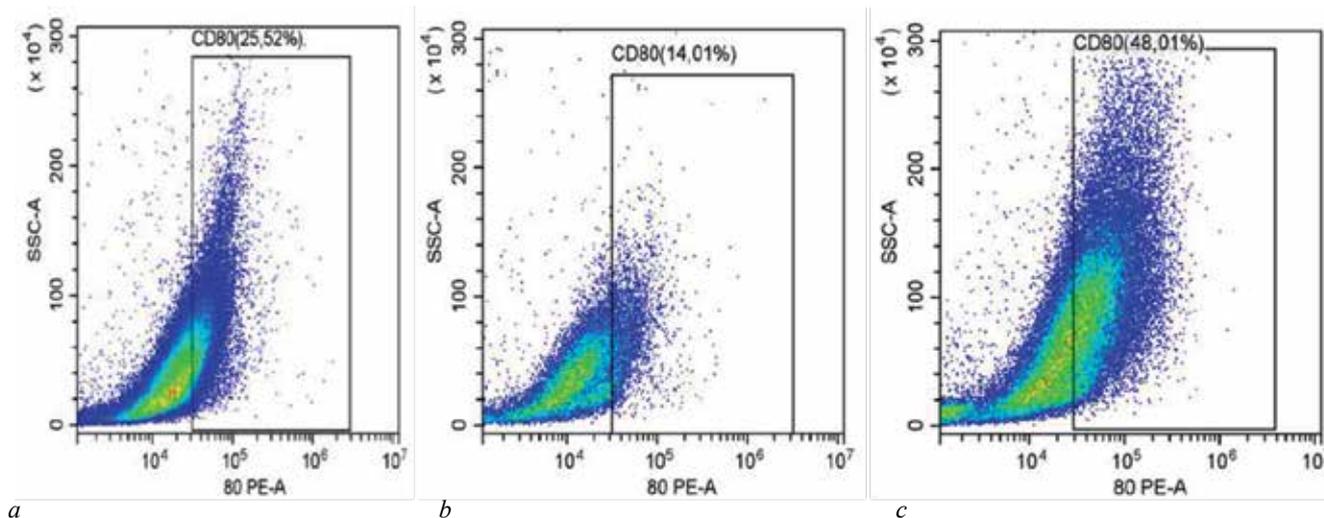


Рис. 1. Экспрессия CD80 на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: *a* – здоровые доноры; *b* – больные ДТБ; *c* – больные ИТБ

Анализ экспрессии CD80 у больных ТБ в зависимости от чувствительности МВТ к ПТС выявил максимальное количество CD80⁺-макрофагов у больных лекарственно-устойчивым (ЛУ) ТБ относительно их числа у здоровых доноров и больных лекарственно-чувствительным (ЛЧ) ТБ (табл. 2). При этом у больных ЛУ ТБ экспрессия CD80 на макрофагах, стимулированных цитокинами IL-4 и IFN γ была значимо выше, чем на нестимулированных клетках. У больных ЛЧ ТБ после индукции клеток IFN γ (M1-активация) число CD80⁺-макрофагов соответствовало таковому у здоровых доноров, но было в 1,9 раза выше, чем при стимуляции IL-4 (M2-активация) и без добавления цитокинов.

Различий по экспрессии молекулы CD86 макрофагами в отсутствие стимуляции рекомбинантными цитокинами у больных ТБ независимо от клинической

формы заболевания не выявлено (см. табл. 1, рис. 2). Экспрессия CD86 на макрофагах у здоровых доноров повышалась при добавлении в культуру клеток цитокинов: в 3,9 раза в ответ на индукцию IL-4 (M2-активация) и в 2,1 раза – на индукцию IFN γ (M1-активация) сравнительно с таковой без стимуляции. У больных ИТБ количество CD86-экспрессирующих макрофагов при индукции IFN γ было выше, чем при ДТБ, а также по сравнению с их численностью в отсутствие стимуляции и при индукции клеток IL-4 (она, напротив, снижалась) (см. табл. 1). Кроме того, при действии IFN γ увеличение экспрессии CD86 макрофагами отмечалось при ЛУ ТБ по сравнению с группой больных ЛЧ ТБ и у здоровых доноров, а также по сравнению с экспрессией маркера нестимулированными макрофагами и при индукции клеток IL-4 (см. табл. 2).

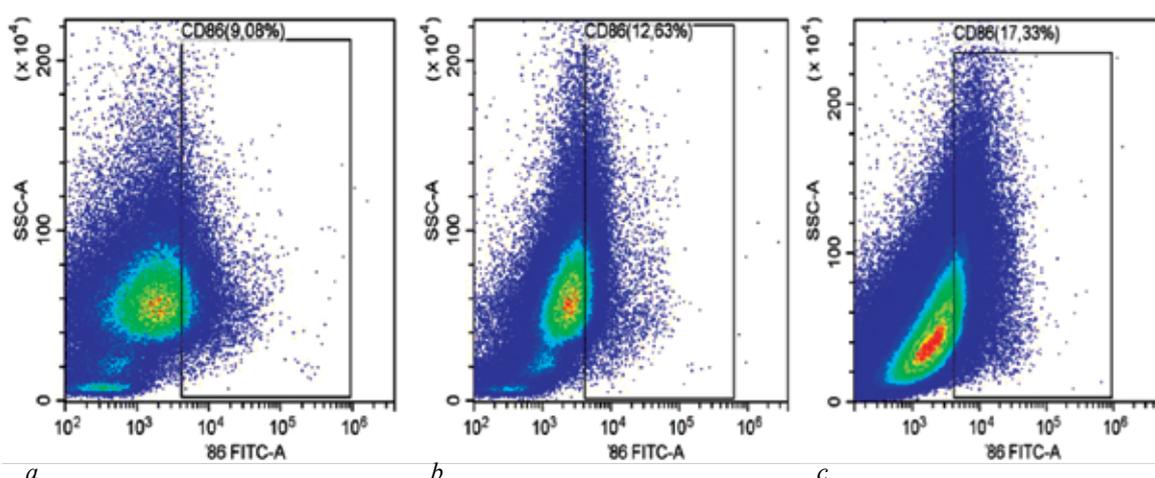


Рис. 2. Экспрессия CD86 на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: *a* – здоровые доноры; *b* – больные ДТБ; *c* – больные ИТБ

Таблица 2

Экспрессия провоспалительных маркеров на макрофагах в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТС, %, Me (Q_1-Q_3)				
Маркеры макрофагов	Группы сравнения	При культивировании без стимуляции	При культивировании с IL-4	При культивировании с IFN γ
CD80	Здоровые доноры	23,11 (15,14–27,11)	15,25 (7,53–25,14)	20,32 (10,91–31,44)
	Больные ДТБ	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 ИТБ	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	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 ДТБ	14,02 (8,51–21,44)	13,54 (10,25–25,11) $p_1 = 0,031$	17,23 (10,32–28,55)
	Больные ИТБ	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	95,61 (76,66–98,73)	97,33 (85,41–98,43)	96,66 (76,32–99,32)
	Больные ДТБ	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 ИТБ	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. Уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя в группе здоровых доноров – p_1 ; у больных с ЛЧ ТБ – p_2 ; при культивировании клеток *in vitro* без стимуляции – p_3 ; при культивировании клеток *in vitro* с IL-4 (M2-стимуляция) – p_4 .

Анализ экспрессии маркера активации HLA-DR на макрофагах выявил ее снижение у больных ТБ независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТС по сравнению с группой здоровых доноров (см. табл. 1, 2, рис. 3).

Максимальное снижение числа макрофагов, экспрессирующих HLA-DR, регистрировалось у больных ДТБ и ЛЧ ТБ после инкубации клеток с IL-4 по сравнению с их количеством при культивировании клеток без стимуляции и при индукции IFN γ .

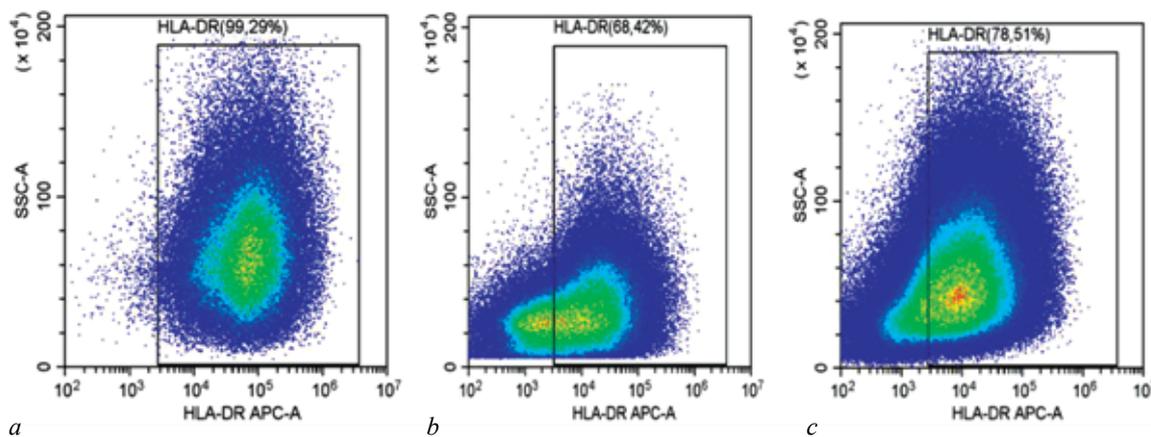


Рис. 3. Экспрессия HLA-DR на макрофагах у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, %: а – здоровые доноры; б – больные ДТБ; с – больные ИТБ

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии провоспалительных маркеров – молекул костимуляции В7 (CD80, CD86) и маркера активации HLA-DR на макрофагах – показал, что у больных ДТБ и ИТБ, особенно при М2-активации клеток, снижается численность макрофагов, экспрессирующих молекулу HLA-DR, которая необходима для полноценной реализации их антигенпрезентирующей функции.

Интересно, что экспрессия на макрофагах молекул CD80 и CD86 у больных ТБ имела разнонаправленный характер. Так, при ИТБ мы наблюдали значительное увеличение числа CD80⁺-клеток, особенно при стимуляции IFN γ (при М1-активации), в то время как при ДТБ количество CD80⁺-макрофагов, напротив, снижалось (см. табл. 1, рис. 1). Отметим, что при ЛУ-варианте течения заболевания экспрессия молекулы CD80 резко повышалась как при М1-, так и при М2-активации макрофагов (см. табл. 2).

Что касается молекулы CD86, то ее экспрессия на нестимулированных макрофагах в целом не отличалась от показателей контрольной группы. Однако при М1-активации клеток у больных с инфильтративным и лекарственно-устойчивым ТБ она повышалась (см. табл. 1, 2). Можно предположить, что интенсивная экспрессия костимулирующей молекулы CD86 при дифференцировке макрофагов *in vitro* в направлении М1-клеток при ИТБ и ЛУ ТБ вызвана сохранением их провоспалительного по-

тенциала. В то же время необходимо учитывать естественную экспрессию CD86 на макрофагах, не зависящую от антигенной нагрузки и медиаторной стимуляции.

Известно, что костимулирующие молекулы CD80 и CD86 являются членами семейства В7 [12]. Маркеры CD80 и CD86 обнаружены не только на дендритных клетках, активированных В-лимфоцитах и макрофагах [13], но и на непрофессиональных антигенпрезентирующих клетках [14]. Молекула CD80, часто в тандеме с CD86, играет важную роль в регуляции как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа. Эти молекулы являются лигандами для рецептора CD28 на наивных Т-лимфоцитах, и их взаимодействие – важный костимулирующий сигнал в иммунологическом синапсе между макрофагом и Т-клеткой, который приводит к активации, пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцитов в необходимом направлении [15]. CD80 является ключевым маркером активации макрофагов, и в отсутствие антигенной нагрузки он не экспрессируется на клетках [16]. При воспалении взаимодействие макрофага через МНС-II с рецептором на Т-клетке приводит к активации CD80 [13].

HLA-DR конститутивно экспрессируется на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Моноциты здоровых людей также экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности. Ранее при исследовании дендритных клеток, трансформированных *in vitro* из моноцитов крови,

у больных ТБ мы показали усиленную генерацию толерогенных дендритных клеток (HLA-DR-негативных), ассоциированную с дисбалансом их цитокинсекреторной активности [17].

Экспрессия HLA-DR на моноцитах и макрофагах имеет ключевое значение для презентации микробных пептидов Т-клеткам, что способствует инициации адаптивного иммунного ответа [18]. Показана отрицательная роль снижения экспрессии HLA-DR на макрофагах. 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 информативным маркером динамики иммунного ответа при критических состояниях [19]. Снижение численности HLA-DR-позитивных моноцитов описано при тяжелых травмах, в постоперационном периоде, при остром панкреатите и ожоговой болезни [20, 21]. При развитии внутрибольничной инфекции снижение экспрессии на моноцитах HLA-DR опосредует развитие сепсиса [22].

Таким образом, установленное нами значительное снижение числа HLA-DR-позитивных клеток (особенно у больных ДТБ) (см. табл. 1, рис. 3) свидетельствует о нарушении механизма классической активации макрофагов и их антигенпрезентирующей и эффекторной функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, изменения *in vitro* экспрессии на макрофагах молекул костимуляции CD80/CD86 у больных ТБ имеют разнонаправленный характер. При ДТБ и ЛЧ ТБ численность интактных (нестимулированных) CD80-позитивных макрофагов ниже, а при ИТБ и ЛУ ТБ – выше нормы, как в отсутствие стимуляции, так и при M2- и, особенно, M1-активации макрофагов. Последнее в сочетании с увеличением экспрессии молекулы CD86 при IFN γ -опосредованной M1-индукции макрофагов у больных ИТБ и ЛУ ТБ свидетельствует о повышении провоспалительной реактивности клеток при данных формах течения ТБ. Отсутствие повышения или, напротив, снижение экспрессии CD80 и CD86 на макрофагах в ответ на стимуляцию цитокинами у больных ДТБ и ЛЧ ТБ в сочетании с дефицитом экспрессии на клетках HLA-DR – ключевого маркера их провоспалительной активации – при обеих клинических формах ТБ вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя можно рассматривать как патогенетический фактор иммунного дисбаланса и проявление вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких, а также показатель неблагоприятного прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Воронкова О.В., Филинук О.В., Шилько Т.А. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5 (2): 70–74.
2. Murray P., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11 (11): 723–737. DOI: 10.1038/nri3073.
3. Чурина Е.Г., Ситникова А.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Винс М.В., Береснева А.Е., Новицкий В.В. Макрофаги при бактериальных болезнях легких: фенотип и функции (обзор). *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 142–154. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-142-154.
4. Swirski F.K., Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339 (6116): 161–166. DOI: 10.1126/science.1230719.
5. Possamai L.A., Thursz M.R., Wendon J.A., Antoniadis C.G. Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. *J. Hepatol.* 2014; 61 (2): 439–445. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.03.031.
6. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.* 2011; 11: 2391–2402. DOI: 10.1100/2011/213962.
7. Hussell T., Bell T. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Immunol.* 2014; 14 (2): 81–93. DOI: 10.1038/nri3600.
8. Hoeffel G., Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Immunology*. 2015; 6: 486. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00486.
9. Schenk M., Fabri M., Krutzik S.R., Lee D.J., Vu D.M., Sieling P.A., Montoya D., Liu P.T., Modlin R.L. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014; 141 (2): 174–180. DOI: 10.1111/imm.12167.
10. Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010; 32 (5): 593–604. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
11. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 1 (13): 453–461. DOI: 10.2741/2692.
12. Peyravian N., Gharib E., Moradi A., Mobahat M., Tarban P., Azimzadeh P., Nazemalhosseini-Mojarad E., Asadzadeh Aghdaci H. Evaluating the expression level of co-stimulatory molecules CD 80 and CD 86 in different types of colon polyps. *Curr. Res. Transl. Med.* 2018; 66 (1): 19–25. DOI: 10.1016/j.retram.2017.11.003.
13. Owen J., Punt J., Stranford S., Jones P., Kuby J. *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman & Co., 2013: 574.
14. Scarpa M., Brun P., Scarpa M., Morgan S., Porzionato A., Kotsafti A., Bortolami M., Buda A., D’Inca R., Macchi V., Sturmiolo G.C., Rugge M., Bardini R., Castagliuolo J., Angriman I., Castoro C. CD80-CD28 signaling controls the progression of inflammatory colorectal carcinogenesis. *Oncotarget*. 2015; 6 (24): 20058–20069. DOI: 10.18632/oncotarget.2780.
15. Ganesan A., Moon T.C., Barakat K.H. Revealing the atomistic details behind the binding of B7-1 to CD28 and CTLA-4: A comprehensive protein-protein modelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2018; 1862 (12): 2764–2778. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.08.010.

16. Wang L.X., Mei Z.Y., Zhou J.H., Yao Y.S., Li Y.H., Xu Y.H., Li J.X., Gao X.N., Zhou M.H., Jiang M.M., Gao L., Ding Y., Lu X.C. Low dose decitabine treatment induces CD80 expression in cancer cells and stimulates tumor specific cytotoxic T lymphocyte responses. *PLoS One*. 2013; 8 (5): e62924. DOI: 10.1371/journal.pone.0062924.
17. Urazova O.I., Churina E.G., Hasanova R.R., Novitskiy V.V., Poletika V.S. Association between polymorphisms of cytokine genes and secretion of IL-12p70, IL-18, and IL-27 by dendritic cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2019; 115: 56–62. DOI: 10.1016/j.tube.2019.02.003.
18. Zhuang Y., Peng H., Chen Y., Zhou S., Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2017; 22: 1344–1354. DOI: 10.2741/4547.
19. Venet F., Lukaszewicz A.C., Payen D., Hotchkiss R., Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin. Immunol.* 2013; 25 (4): 477–483. DOI: 10.1016/j.coi.2013.05.006.
20. Monneret G., Venet F., Pachot A., Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.* 2008; 14 (1-2): 64–78. DOI: 10.2119/2007-00102.
21. Monneret G., Lepape A., Voirin N., Bohe J., Venet F., Debarb A.L. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006; 32 (8): 1175–1183. DOI: 10.1007/s00134-006-0204-8.
22. Grimaldi D., Louis S., Pène F., Sirgo G., Rousseau C., Claessens Y. E., Vimeux L., Cariou A., Mira J. P., Hosmalin A., Chiche J.D. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock intensive care. *Med.* 2011; 37 (9): 1438–1446. DOI: 10.1007/s00134-011-2306-1.

Вклад авторов

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

Сведения об авторах

Чурина Елена Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра органической химии, вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-8509-9921.

Ситникова Анжелика Владимировна, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID 0000-0002-9457-8879.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ; профессор, кафедра комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем, ТУСУР, г. Томск. ORCID 0000-0002-9577-8370.

Патышева Марина Ринатовна, мл. науч. сотрудник, лаборатория биологии опухолевой прогрессии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-5758-7330.

Голубчиков Петр Николаевич, зам. гл. врача по медицинской части, Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, г. Томск.

Степанова Екатерина Петровна, врач-фтизиатр, врач-пульмонолог, зав. отделением для больных туберкулезом органов дыхания, Томский фтизиопульмонологический медицинский центр, г. Томск.

(✉) Чурина Елена Георгиевна, e-mail: Lena1236@yandex.ru.

Поступила в редакцию 18.06.2020
Подписана в печать 29.09.2020