

ДИСФУНКЦИИ МАКРОФАГОВ, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Людмила Васильевна САХНО¹, Марина Александровна ТИХОНОВА¹, Сергей Данилович НИКОНОВ², Олег Александрович ЖДАНОВ², Александр Анатольевич ОСТАНИН¹, Елена Рэмовна ЧЕРНЫХ¹

¹НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

²Новосибирская клиническая туберкулезная больница № 1
630082, г. Новосибирск, ул. Вавилова, 14

В работе исследованы фенотипические и функциональные свойства макрофагов, генерированных из моноцитов крови здоровых доноров и больных туберкулезом легких, включая больных с сохранным и сниженным ответом на очищенный туберкулин (ППД). Показано, что макрофаги ППД-анергичных больных характеризуются низким содержанием клеток, экспрессирующих антигены HLA-DR и CD86, дисбалансом продукции цитокинов (уменьшенной секрецией интерферона- γ , ИЛ-18 и повышенной продукцией ИЛ-6, ИЛ-10), а также низкой аллостимуляторной активностью в смешанной культуре лимфоцитов. Полученные данные позволяют предположить наличие взаимосвязи между изменением свойств макрофагов и нарушением антигенспецифического Т-клеточного ответа при туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: макрофаги, цитокины, аллостимуляторная активность, туберкулез легких.

Хорошо известно, что у преобладающего большинства людей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, активная болезнь не развивается, что указывает на возможность эффективного контроля туберкулезной инфекции со стороны иммунной системы. Ведущая роль в механизмах иммунной защиты отводится клеточным реакциям врожденного и адаптивного иммунитета, опосредуемых макрофагами (Мф) и Т-клетками. Первичное инфицирование макрофагов *M. tuberculosis* приводит к активации их микробицидной функции, направленной на непосредственное уничтожение патогена. Кроме того, поглощение микобактерий индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов, которые ограничивают рост фагоцитированных микроорганизмов и обеспечивают рекрутирование и активацию дополнительного количества лейкоцитов [1, 2]. Впоследствии подавление роста и элиминация *M. tuberculosis* определяется эффективностью межклеточного взаимодействия макрофагов и рекрутированных антигенспецифических Т-лимфоцитов. Так, в ответ на Т-клеточные активирующие сигналы происходит выраженное усиление цитотоксической активности макрофагов, направленной против внутриклеточных патогенов. *Поскольку одним из ключевых факторов, стимули-*

рующих цитотоксическую активность макрофагов, является интерферон-гамма (ИФН- γ), продуцируемый Т-хелперными клетками I типа (Th1), активация Th1 рассматривается в качестве необходимой составляющей эффективного контроля за туберкулезной инфекцией [3, 4].

Функциональная активность макрофагов, а также баланс продуцируемых ими про- и противовоспалительных цитокинов во многом определяют направленность и силу развития протективного, антигенспецифического Т-клеточного ответа при туберкулезной инфекции. Нарушение функций макрофагов в очаге поражения может быть обусловлено непосредственным действием микобактериальных антигенов, способных подавлять образование фаголизосом и ингибировать экспрессию ко-стимуляторных молекул [5–8]. Кроме того, дисфункции макрофагов могут быть связаны с изменением свойств циркулирующих моноцитов, которые рекрутируются в очаг повреждения. Ранее нами и другими авторами было показано, что моноциты периферической крови больных туберкулезом легких отличаются повышенной супрессорной активностью, обусловленной синтезом интерлейкина-10 (ИЛ-10), и сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул [9–12].

Сахно Л.В. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории клеточной иммуноterapiи, e-mail: ct_lab@mail.ru

Тихонова М.А. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории клеточной иммуноterapiи, e-mail: ct_lab@mail.ru

Никонов С.Д. — д.м.н., проф., зав. отделением гравитационной хирургии крови, e-mail: sibnovomed@mail.ru

Жданов О.А. — врач анестезиолог-реаниматолог, e-mail: sibnovomed@mail.ru

Останин А.А. — д.м.н., проф., руководитель клинического отдела, e-mail: ct_lab@mail.ru

Черных Е.Р. — д.м.н., проф., руководитель лаборатории клеточной иммуноterapiи, ct_lab@mail.ru

Следовательно, можно предположить, что дифференцирующиеся из моноцитов макрофаги также могут иметь ряд дисфункций. Исходя из этого, целью исследования стало изучение фенотипических и функциональных свойств макрофагов, генерируемых из моноцитов периферической крови больных туберкулезом легких.

Материал и методы

В исследование были включены 64 больных туберкулезом легких: 36 (56 %) мужчин и 28 (44 %) женщин в возрасте от 20 до 60 лет. Обследованная группа включала 11 (17,2 %) пациентов с фиброзно-кавернозной, 44 (68,8 %) пациента с инфильтративной и 9 (14 %) пациентов с диссеминированной формами туберкулеза. Активное бацилловыделение было выявлено у 28 (43,8 %) больных. При лабораторном исследовании лекарственная резистентность *M. tuberculosis* регистрировалась у 18 (28,1 %) пациентов. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту.

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина и культивировали ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 («Sigma-Aldrich», США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10 % инактивированной сыворотки доноров крови IV (AB) группы при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали туберкулиновый очищенный белковый дериват (ППД) в концентрации 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сут по включению ³H-тимидина (1 мКи на лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. В зависимости от уровня пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на ППД больные были разделены на 2 подгруппы: подгруппа 1 – с сохранным (> 12 500 имп/мин; n = 40) и подгруппа 2 – со сниженным (< 12 500 имп/мин; n = 24) ответом на ППД.

Макрофаги получали путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови в 6-луночных планшетах («Nunc», Дания) в среде RPMI-1640 дополненной 5 % аутоплазмы, 2 % сыворотки крови плодов коровы («Биолот», Санкт-Петербург), 2-меркаптоэтанолом (5×10^{-5} М, «Serva», Германия), пируватом Na (2×10^{-3} М, «Sigma-Aldrich»), 1 % раствором незаменимых аминокислот в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ; 50 нг/мл, «Sigma-Aldrich») в течение 6 сут. По окончании культивирования отделение Мф от пластиковой поверхности осуществляли с использованием 20 мМ раствора этилендиаминтетраацетата. Полученные Мф 2-кратно отмывали средой RPMI-1640, дополненной 5 % сыворотки крови плодов коровы.

Продукцию фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), ИЛ-1, рецепторного антагониста интерлейкина-1 (РАИЛ), ИЛ-6, ИЛ-10, трансформирующего рост фактора- β_1 (ТРФ- β_1), интерферона- γ (ИФН- γ) и ИЛ-18 оценивали в супернатантах 6-суточных культур Мф, а также в 24-часовых супернатантах Мф, нестимулированных и стимулированных липополисахаридом (ЛПС *E. coli* 0111:B4, «Sigma-Aldrich») в дозе 10 мкг/мл. Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы производства «Вектор-Бест», Новосибирск (ФНО- α , ИЛ-1, РАИЛ, ИЛ-6, ИФН- γ , ИЛ-18), «Цитокин», Санкт-Петербург (ИЛ-10) или «R&D Systems», Великобритания (ТРФ- β_1).

Аллостимуляторную активность Мф оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании мононуклеарных клеток доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных Мф здоровых доноров или больных туберкулезом в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сут радиометрически по включению ³H-тимидина. Индекс влияния Мф (ИВ_{Мф}) в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа мононуклеарных клеток в присутствии Мф к уровню их спонтанной пролиферации.

Оценку поверхностных маркеров Мф проводили методом проточной цитометрии («FACS Calibur, Becton Dickinson», США) с использованием моноклональных FITC-меченных антител (для оценки экспрессии CD16 и HLA-DR) или PE-меченных анти-CD14-антител («Сорбент», Москва), а также FITC-меченных анти-CD86-антител («BD PharMingen», США).

Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, где M – среднее арифметическое значение, $S.E.$ – ошибка среднего арифметического значения. Различия между подгруппами оценивали с помощью критериев Стьюдента для независимых выборок (t) и Вилкоксона – Манна – Уитни (U), достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Популяция прилипающих к пластику клеток у больных туберкулезом так же, как и у здоровых доноров, была представлена в основном CD14⁺-моноцитами ($76,9 \pm 2,3$ и $82,4 \pm 2,8$ %, соответственно). В результате 6-суточного культивирования с ГМ-КСФ моноциты приобретали типичные морфологические черты макрофагов в виде появления крупных клеток с большой цитоплазмой и ядром неправильной формы. Жизнеспособность Мф во всех экспериментах была не менее 90 % и не различалась у доноров и больных туберкулезом. Среднее количество генерируемых Мф также было сопоставимо и составляло в исследуемых группах доноров и больных туберкулезом соответственно 40 ± 9 и $31 \pm 5 \times 10^3$ Мф/ 10^6 мононуклеарных клеток.

Таблица 1

Фенотипическая характеристика Мф здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Маркеры	Здоровые доноры (n = 18)	Больные туберкулезом		
		В целом по группе (n = 20)	Подгруппа 1 (n = 11)	Подгруппа 2 (n = 9)
CD14 ⁺ (%)	78 ± 3,9	78 ± 2,8	79 ± 4,1	76 ± 4,0
CD16 ⁺ (%)	29 ± 3,8	41 ± 4,2	50 ± 5,6*	30 ± 4,2*
HLA-DR ⁺ (%)	91 ± 2,2	89 ± 3,1	96 ± 1,7	80 ± 4,8*, #
CD86 ⁺ (%)	38 ± 4,7	26 ± 5,4*	31 ± 9,4	19 ± 3,9*

Примечание: здесь и в табл. 2, 3: * — отличие от соответствующего показателя в группе доноров достоверно при $p_U < 0,05$; # — отличие от соответствующего показателя в подгруппе 1 достоверно при $p_U < 0,05$.

Сравнительный фенотипический анализ полученных Мф показал (табл. 1), что и у доноров, и у больных туберкулезом преобладающее большинство клеток (около 80 %) экспрессировали CD14. При этом около трети полученных Мф здоровых доноров и половина Мф больных туберкулезом также экспрессировали CD16. Интересно отметить, что у больных с сохранным ответом на ППД относительное количество CD16⁺-Мф было достоверно выше, чем у доноров или у пациентов со сниженным ответом на ППД. Снижение доли CD86-позитивных клеток, которое обнаруживалось в общей группе больных туберкулезом, было обусловлено, главным образом, наиболее выраженным (2-кратным) уменьшением их количества у пациентов с ППД-анергией, тогда как в подгруппе ППД-реактивных больных относительное содержание CD86⁺-Мф оставалось сохранным. Кроме того, у ППД-анергичных больных отмечалось умеренное, но статистически достоверное снижение относительного количества HLA-DR⁺Мф. Таким образом, генерируемые *in vitro* Мф у больных с сохранным антигенспецифическим ответом практически не отличаются по своему фенотипу от Мф здоровых доноров, за исключением повышенного содержания CD16⁺-клеток. Напротив, клеточная популяция, полученная от ППД-анергичных больных, характеризовалась количественным дефицитом макрофагов, экспрессирующих молекулы, необходимые для эффективной презентации антигена (HLA-DR) и ко-стимуляции Т-клеток (CD86).

Исследование содержания цитокинов в супернатантах 6-суточных культур макрофагов не выявило статистически значимых различий в уровне продукции ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-18, ИЛ-1, РАИЛ и ТРФ- β_1 в подгруппах здоровых доноров и больных туберкулезом (табл. 2). Тем не менее у последних регистрировалось выраженное 10-кратное снижение

уровня ИФН- γ и 2-кратное снижение продукции ИЛ-1 ($p_U < 0,05$), а также отмечалась отчетливая тенденция к увеличению синтеза ТРФ- β_1 (в среднем до 1835 против 1197 пкг/мл у доноров). Кроме того, Мф пациентов со сниженным антигенспецифическим ответом характеризовались практически 3-кратным увеличением продукции ИЛ-10 и достоверно отличались по этому показателю от Мф как здоровых доноров, так и пациентов с сохранным ППД-ответом. Полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе цитокинов, продуцируемых Мф больных туберкулезом, который проявляется в виде повышенной секреции противовоспалительных и иммуносупрессорных медиаторов (ИЛ-10, ТРФ- β_1) в сочетании с недостаточностью продукции цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-1), участвующих в запуске и контроле воспалительных и клеточно-опосредованных иммунных реакций. Важно отметить, что выявленные нарушения цитокин-секреторной функции Мф были в большей степени характерны для пациентов со сниженным антигенспецифическим ответом на ППД.

Исследования цитокинов, которые Мф секретируют на этапе генерации в течение всего периода 6-суточного культивирования, были дополнены оценкой уровня спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов в 24-часовых культурах Мф, стандартизованных по количеству клеток-продуцентов ($0,05 \times 10^6$ Мф/лунку). Как видно из данных табл. 3, Мф больных туберкулезом в целом сохраняют свою цитокин-секреторную функцию и активно продуцируют про- (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-18) и противовоспалительные (РАИЛ-1, ИЛ-10) медиаторы на уровне, сопоставимом с донорскими значениями. При этом, однако, регистрировалось нарушение продукции ИФН- γ , которое проявлялось снижением уровня спонтанной секреции цитокина и отсутствием чувствительности Мф к сти-

Таблица 2

Цитокин-секреторная активность Мф здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Содержание цитокинов, пкг/мл	Здоровые доноры	Больные туберкулезом		
		В целом по группе	Подгруппа 1	Подгруппа 2
ФНО- α	557 \pm 95 (14)	447 \pm 70 (25)	508 \pm 120 (11)	399 \pm 83 (14)
ИЛ-1	769 \pm 199 (8)	375 \pm 140* (12)	397 \pm 198 (7)	345 \pm 217 (5)
РАИЛ	9896 \pm 405 (10)	10 508 \pm 247 (12)	10 560 \pm 250 (7)	10 435 \pm 517 (5)
ИЛ-6	2119 \pm 39 (10)	1740 \pm 173 (13)	1820 \pm 220 (7)	1645 \pm 291 (6)
ИЛ-10	53 \pm 22 (13)	98 \pm 30 (17)	53,5 \pm 24 (10)	162 \pm 58*, # (7)
ТРФ- β_1	1197 \pm 127 (7)	1835 \pm 423 (11)	1895 \pm 612 (7)	1733 \pm 569 (4)
ИФН- γ	2588 \pm 1232 (5)	284 \pm 77* (12)	315 \pm 104* (8)	221 \pm 109* (4)
ИЛ-18	41 \pm 6,7 (7)	51 \pm 8,5 (13)	44 \pm 10 (8)	62 \pm 15 (5)

Примечание: представлены средние значения содержания цитокинов в супернатантах 6-суточных культур МФ, генерированных из моноцитов крови доноров и больных туберкулезом в присутствии ГМ-КСФ; в скобках – количество наблюдений.

муляции эндотоксином ($IB_{\text{ЛПС}} = 1,1$; $p_U < 0,05$). Видно, что средний уровень спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции ИФН- γ в культурах Мф больных туберкулезом составлял соответственно 59 и 54 пкг/мл, что было в 2 и 6 раз ниже значений здоровых доноров.

Сравнительный анализ продукции ИФН- γ макрофагами больных, опозитных по характеру пролиферативного ответа мононуклеарных клеток на ППД, показал, что в обеих подгруппах выражен дефект спонтанного и особенно ЛПС-стимулированного синтеза цитокина. Тем не менее Мф ППД-отвечающих больных отличались максимально высоким уровнем спонтанной секреции ИЛ-18, что, возможно, в определенной степени компенсирует дефицит продукции ИФН- γ и позволяет сохранить чувствительность Т-клеток к антигенам *M. tuberculosis in vitro*. В то же время Мф больных со сниженным ответом на ППД характеризовались наиболее выраженными нарушениями продукции ИФН- γ и ИЛ-18, которые сочетались с увеличением уровня спонтанной продукции ИЛ-6 и ЛПС-стимулированной продукции ИЛ-10.

Заключительным этапом работы стало сравнительное исследование аллостимуляторной активности Мф больных и здоровых доноров в СКЛ (табл. 4). Видно, что пролиферативный ответ в алло-СКЛ, индуцированный макрофагами больных туберкулезом, практически в 2 раза ниже, чем в аналогичных культурах, содержащих Мф здоровых доноров (соответственно 8520 ± 1280 и $15\,050 \pm 3090$ имп/мин, $p_1 < 0,05$). Сравнительный анализ аллостимуляторной активности Мф больных с сохранным и сниженным ответом на ППД показал, что наиболее выраженное уменьшение было характерно именно для последних.

Согласно полученным нами ранее данным, около 40 % больных туберкулезом легких характеризуются дефектом антигенспецифического ответа на ППД, что проявляется снижением пролиферации и продукции ИФН- γ [9, 10, 13–15]. Причем, помимо повышенного апоптоза и анергии Т-клеток [15], дефект антигенспецифического ответа ассоциируется с дисфункциями моноцитов [9]. Полученные в настоящем исследовании данные впервые демонстрируют, что Мф, гене-

Таблица 3
Спонтанная и ЛПС-стимулированная продукция цитокинов в 24-часовых культурах Мф доноров и больных туберкулезом легких

Содержание цитокинов, пкг/мл	Условия продукции	Здоровые доноры		Больные туберкулезом			
		В целом по группе		Подгруппа 1		Подгруппа 2	
		Медиана (n)	ИВ _{ЛПС}	Медиана (n)	ИВ _{ЛПС}	Медиана (n)	ИВ _{ЛПС}
ФНО-α	Спонтанная	85,4 (5)		236 (9)		198 (6)	295 (3)
	ЛПС-стимулированная	940 (5)	4,5	940 (9)	4,0	940 (6)	814 (3) 2,3
ИЛ-1	Спонтанная	3,6 (8)		9,1 (15)		8,5 (12)	11 (3)
	ЛПС-стимулированная	13,6 (8)	3,1	15,7 (15)	2,3	16,1 (12)	12 (3) 0,9
РАИЛ	Спонтанная	5040 (9)		5138 (17)		5184 (14)	2904 (3)
	ЛПС-стимулированная	6390 (9)	1,4	6270 (17)	1,1	5594 (14)	6945 (3) 1,2
ИЛ-6	Спонтанная	734 (7)		1127 (13)		691 (9)	1219 (4)*
	ЛПС-стимулированная	2180 (7)	3,0	2200 (13)	2,1	2111 (9)	2212 (4) 1,8*
ИЛ-10	Спонтанная	1,3 (8)		1,3 (16)		1,3 (8)	1,8 (8)
	ЛПС-стимулированная	8,5 (8)	6,1	17,7 (16)	6,2	12,2 (8)	22,3 (8)* 7,2
ИФН-γ	Спонтанная	134 (5)		59 (7)		89,5 (4)	34 (3)*
	ЛПС-стимулированная	326 (5)	2,5	54 (7)*	1,1*	80,5 (4)*	38 (3)* 1,1*
ИЛ-18	Спонтанная	16,9 (5)		24,4 (9)		34,4 (6)*	8,1 (3)*, #
	ЛПС-стимулированная	27,3 (5)	1,6	35,8 (9)	1,4	53,3 (6)	8,6 (3)*, # 1,0

Примечание: представлены медианные значения спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов в 24-часовых культурах Мф ($0,05 \times 10^6$ Мф/дунку) здоровых доноров и больных туберкулезом легких.

Таблица 4

Аллостимуляторная активность Мф здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Пролиферация (имп/мин)	Здоровые доноры (n = 14)	Больные туберкулезом		
		В целом по группе (n = 27)	Подгруппа 1 (n = 21)	Подгруппа 2 (n = 6)
Спонтанная	725 ± 98	650 ± 70	700 ± 90	505 ± 50
Алло-СКЛ	15 050 ± 3090	8520 ± 1280*	9630 ± 1490	4650 ± 1870*.*
ИВ _{Мф}	20,2 ± 3,7	12,2 ± 1,5*	13,7 ± 1,7	7,3 ± 2,5*.*

Примечание: мононуклеарные клетки доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку) культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в отсутствие (спонтанная пролиферация) и в присутствии аллогенных Мф здоровых доноров или больных туберкулезом в соотношении 10:1 (алло-СКЛ); * — отличие от соответствующего показателя в группе доноров достоверно при $p_t < 0,05$, # — отличие от соответствующего показателя в подгруппе 1 достоверно при $p_{\text{д}} < 0,05$.

рируемые из моноцитов крови больных туберкулезом, характеризуются рядом фенотипических и функциональных изменений, которые также четко ассоциируются со сниженным антиген-специфическим ответом на ППД и проявляются низкой экспрессией ко-стимуляторных молекул (CD86, HLA-DR), дисбалансом спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции провоспалительных (ИФН- γ , ИЛ-18) и противовоспалительных/иммуносупрессорных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10), а также снижением аллостимуляторной активности.

Как правило, ИФН- γ продуцируют Т-лимфоциты и НК-клетки, но отдельные публикации так же, как и полученные нами данные, свидетельствуют о возможности синтеза ИФН- γ самими макрофагами [16, 17]. Вероятно, в этом случае ИФН- γ может выступать в качестве аутокринного фактора, стимулирующего функциональную активность макрофагов.

Известно, что уничтожение внутриклеточных микроорганизмов реализуется с вовлечением Т-хелперных клеток 1-го типа (Th1-клеток), в то время как элиминация внеклеточных патогенов осуществляется с участием Th2-клеток. Поэтому факторы, которые регулируют поляризацию иммунных реакций, являются определяющими для формирования адекватного иммунного ответа по Th1- или Th2-направлению. В этом контексте обнаруженный нами дефект продукции Мф таких цитокинов, как ИФН- γ и ИЛ-18, в сочетании с повышенной продукцией ИЛ-6 и ИЛ-10 может, по-видимому, являться одной из причин нарушения антигенспецифического ответа при туберкулезной инфекции. Действительно, хорошо известно, что секретируемый антиген-презентирующими клетками ИЛ-6 способен вызывать поляризацию наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в сторону Th2, а ИЛ-10 является ингибитором Th1-клеток [1, 18, 19]. Снижение экспрессии HLA-DR и ко-стимуляторных

молекул в совокупности с усилением продукции иммуносупрессорных цитокинов, очевидно, тесно связано с нарушением антигенпрезентирующей функции Мф, выявленным нами в виде снижения их аллостимуляторной активности в СКЛ.

Согласно данным литературы, Мф обладают функциональной плюрипотентностью и способны не только активировать, но и подавлять Т-клеточные иммунные реакции. Причем наличие той или иной регуляторной активности макрофагов отчасти определяется особенностями их активации [4, 20]. Например, супрессорную активность Мф связывают с их альтернативной активацией в присутствии Th2-цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-13) или макрофагального колониестимулирующего фактора. Фенотипическим признаком альтернативно активированных макрофагов является низкая экспрессия антигенов HLA-DR и CD86, а функциональной особенностью — усиление продукции противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ТРФ- β) и снижение антигенпрезентирующей функции [4, 20]. Мф, полученные из моноцитов крови ППД-анергичных больных, по своим характеристикам очень схожи с альтернативно активированными макрофагами, поскольку также низко экспрессируют антигены HLA-DR и CD86, характеризуются повышенной продукцией ИЛ-6, ИЛ-10 и низкой аллостимуляторной/антигенпрезентирующей активностью в СКЛ. При этом отсутствие указанных дисфункций у макрофагов больных с сохранным ответом на ППД позволяет предположить наличие взаимосвязи между изменением свойств Мф и нарушением антигенспецифического Т-клеточного ответа при туберкулезной инфекции.

Обычно причины нарушения функций макрофагов при туберкулезной инфекции обсуждают в контексте непосредственного влияния на них микобактерий и/или их антигенов [1, 21]. Проведенные нами исследования показали, что дефект

макрофагов может быть обусловлен не только прямым воздействием микобактерий, но и генерацией иммуносупрессивных (альтернативно активированных?) макрофагов из моноцитов, которые рекрутируются в очаг туберкулезной инфекции из периферической крови больного.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы.

1. Снижение экспрессии ко-стимуляторных молекул (CD86) и антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) в культурах макрофагов ППД-анергичных больных и отсутствие указанных изменений у пациентов с сохранным пролиферативным ответом на ППД указывает на нарушение дифференцировки/созревания макрофагов у больных с дефектом антигенспецифического ответа.

2. Макрофаги, генерированные из моноцитов крови больных со сниженным антигенспецифическим ответом, характеризуются нарушением антигенпрезентирующей и цитокинсекретирующей функций, что подтверждается усилением спонтанной продукции ИЛ-6 и ЛПС-стимулированной продукции ИЛ-10, а также снижением аллостимуляторной активности макрофагов.

Список литературы

1. *Giacomini E., Iona E., Ferroni L. et al.* Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T-cell response // *J. Immunol.* 2001. 166. (12). 7033–7041.
2. *Van Crevel R., Ottenhoff T.H.M., van der Meer J.W.M.* Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. 15. (2). 294–309.
3. *Hickman S.P., Chan J., Salgame P.* *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T-cell polarization // *J. Immunol.* 2002. 168. (9). 4636–4642.
4. *Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M. et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. 101. (3). 4560–4565.
5. *Noss E.H., Pai R.K., Sellati T.J. et al.* Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Immunol.* 2001. 167. (2). 910–918.
6. *Pieters J., Gatfield J.* Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages // *Trends Microbiol.* 2002. 10. (3). 142–146.
7. *Singh B., Singh G., Trajkovic V., Sharma P.* Intracellular expression of *Mycobacterium tuberculosis*-specific 10-kDa antigen down-regulates macrophage B7.1 expression and nitric oxide release // *Clin. Exp. Immunol.* 2003. 134. (1). 70–77.
8. *Stenger S., Niaz K.R., Modlin R.L.* Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Immunol.* 1998. 161. (7). 3582–3588.
9. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Кожевников В.С. и др. Фенотипическая и функциональная характеристика моноцитов у больных туберкулезом легких // *Мед. иммунол.* 2005. 7. (1). 49–56.
10. *Sakhno L.V., Tihonova M.A., Kozhevnikov V.S. et al.* The phenotype and function of monocytes in patients with pulmonary tuberculosis // *Med. immunol.* 2005. 7. (1). 49–56.
11. Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Характеристика дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона- α , у больных туберкулезом легких // *Пробл. туберкулеза и болезней легких.* 2007. (3). 42–46.
12. *Sakhno L.V., Leplina O.Yu., Tihonova M.A. et al.* Characteristics of α -interferon-generated dendritic cells in patients with pulmonary tuberculosis // *Probl. tuberkuleza i boleznei legkikh.* 2007. (3). 42–46.
13. *Fietta A., Meloni F., Francioli C. et al.* Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* affects interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 production by human mononuclear phagocytes // *Int. J. Tissue React.* 2001. 23. (4). 113–125.
14. *Pereira C.B., Palaci M., Leite O.H. et al.* Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations // *Microbes. Infect.* 2004. 6. (1). 25–33.
15. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В. и др. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // *Пробл. туберкулеза и болезней легких.* 2004. (5). 23–28.
16. *Sakhno L.V., Tihonova M.A., Kurganova E.V. et al.* T-cellular anergy in the pathogenesis of immunodeficiency in pulmonary tuberculosis // *Probl. tuberkuleza i boleznei legkikh.* 2004. (5). 23–28.
17. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В. и др. Участие оксида азота в развитии туберкулиновой анергии у больных туберкулезом легких // *Пробл. туберкулеза и болезней легких.* 2001. (8). 42–46.
18. *Sakhno L.V., Khonina N.A., Norkina O.V. et al.* Involvement of nitric oxide in the development of tuberculin anergy in patients with pulmonary tuberculosis // *Probl. tuberkuleza i boleznei legkikh.* 2001. (8). 42–46.
19. Черных Е.Р., Сахно Л.В., Хонина Н.А. и др. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу у больных туберкулезом легких // *Пробл. туберкулеза и болезней легких.* 2002. (7). 43–48.
20. *Chernykh E.R., Sakhno L.V., Khonina N.A. et al.* T-cell subsets undergoing apoptosis and anergy in patients with pulmonary tuberculosis // *Probl. tuberkuleza i boleznei legkikh.* 2002. (7). 43–48.
21. *Gessani S., Belardelli F.* IFN- γ expression in macrophages and its possible biological significance // *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998. 9. 117–123.

17. Munder M., Mallo M., Eichmann K., Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation // *J. Exp. Med.* 1998. 187. 2103–2108.
18. Geijtenbeek T.B., van Vliet S.J., Koppel E.A. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function // *J. Exp. Med.* 2003. 197. (1). 7–17.
19. Rincon M., Anguita J., Nakamura T. et al. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T-cells // *J. Exp. Med.* 1997. 185. (3). 461–469.
20. Gordon S. Alternative activation of macrophages // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. 3. (1). 23–35.
21. Ильинская А.Н., Пичугина Л.В., Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Сравнительная оценка некоторых функциональных изменений при стимуляции PPD макрофагов и дендритных клеток, полученных из периферической крови здоровых доноров // *Иммунология.* 2006. 4. 209–211.
- Ильинская А.Н., Пичугина Л.В., Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Comparative estimation of some functional changes of PPD-stimulated macrophages and dendritic cells, separated from peripheral blood of healthy donors // *Immunologiya.* 2006. (4). 209–211.

DYSFUNCTIONS OF MACROPHAGES, GENERATED FROM BLOOD MONOCYTES OF THE PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Luydmila Vasil'evna SAKHNO¹, Marina Aleksandrovna TIKHONOVA¹, Sergey Danilovich NICONOV², Oleg Aleksandrovich ZHDANOV², Aleksandr Anatolievich OSTANIN¹, Elena Removna CHERNYKH¹

¹*Institute of Clinical Immunology SB RAMS
630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya st., 14*

²*Novosibirsk Clinical Tubercular Hospital № 1
630082, Novosibirsk, Vavilova st., 14*

The phenotype and functional properties of macrophages, generated from peripheral blood monocytes of healthy donors and patients with pulmonary tuberculosis with or without PPD-anergy, were investigated. It was revealed that macrophages of PPD-anergic patients were characterized by decreasing of CD86⁺ and HLA-DR⁺ cells, by shifting of Th1/Th2 cytokines balance (down-production of IFN-gamma, IL-18 and up-production of IL-6, IL-10), and by reducing of allostimulatory activity in mixed lymphocyte reaction. Our data allow proposing that macrophage dysfunctions in patients with pulmonary tuberculosis are associated with decrease of antigenspecific T-cell response to *M. tuberculosis*.

Key words: macrophages, cytokines, allostimulatory activity, pulmonary tuberculosis.

Sakhno L.V. — candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of cellular immunotherapy, e-mail: ct_lab@mail.ru

Tikhonova M.A. — candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of cellular immunotherapy, e-mail: ct_lab@mail.ru

Nikonov S.D. — doctor of medical sciences, professor, head of department of blood gravitational surgery, e-mail: sibnovomed@mail.ru

Zhdanov O.A. — physician of intensive care medicine, e-mail: sibnovomed@mail.ru

Ostanin A.A. — doctor of medical sciences, professor, head of clinical department, e-mail: ct_lab@mail.ru

Chernykh E.R. — doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of cellular immunotherapy, e-mail: ct_lab@mail.ru