

ДЕФЕКТ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Сахно Л.В., Распай Ж.М., Тихонова М.А., Никонов С.Д.¹,
Жданов О.А.¹, Останин А.А., Черных Е.Р.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

¹ ОГУЗ Новосибирская клиническая туберкулезная больница № 1, г. Новосибирск

Резюме. В работе были исследованы фенотипические и функциональные свойства антигенпрезентирующих клеток (АПК: моноцитов крови и генерированных *in vitro* макрофагов / дендритных клеток) у больных туберкулезом легких (ТБ, n = 192), различающихся по уровню пролиферативного ответа на антигены *M. tuberculosis* (PPD-отвечающие и PPD-анергичные пациенты, n = 118 и 74 соответственно). Установлено, что у больных ТБ изменены все три типа АПК. На уровне моноцитов это проявляется снижением экспрессии CD86 и HLA-DR молекул, 2-кратным увеличением субпопуляции CD14⁺CD16⁺ клеток, FasL⁺ и IL-10⁺ моноцитов, а также повышенной продукцией IL-10 и IL-6 в ответ на стимуляцию эндотоксином. На уровне макрофагов регистрируется дисбаланс продукции Th1/Th2-цитокинов (снижение продукции IFN γ и IL-18 в сочетании с усилением продукции IL-6 и IL-10), а также снижение аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов. На уровне дендритных клеток это проявляется снижением количества зрелых активированных CD25⁺ клеток, дефицитом продукции IFN γ в сочетании с повышенной способностью секретировать IL-10 и IL-6 и нарушением функциональной (аллостимуляторной) активности. При этом наиболее выраженные изменения свойств различных типов АПК регистрируются в подгруппе больных ТБ со сниженным пролиферативным ответом на PPD. Обсуждается возможная роль дисфункций АПК в нарушении антигенспецифического ответа при туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, дендритные клетки, цитокины, туберкулез легких.

Sakhno L.V., Raspay Zh.M., Tikhonova M.A., Nikonov S.D., Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

A DEFICIENCY OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Abstract. The phenotype and functional properties of antigen-presenting cells (APCs: blood monocytes and *in vitro* generated macrophages/dendritic cells) were investigated in patients with pulmonary tuberculosis (TB, n = 192) with different levels of proliferative response to *M. tuberculosis* antigens (PPD-responsive vs PPD-anergic patients, n = 118 and 74, respectively). A functional deficiency of all 3 types of APCs was revealed in patients with TB. I.e., a monocyte dysfunction was displayed by low CD86 and HLA-DR expression, 2-fold increase of CD14⁺CD16⁺ subset, high level of FasL⁺ and IL-10⁺ cells, and enhanced IL-10 and IL-6 production upon LPS-stimulation. The *in vitro* generated macrophages from blood monocytes challenged with GM-CSF, were characterized by shifted Th1/Th2 balance (down-regulated production of IFN γ and IL-18 combined with up-regulation of IL-6 and IL-10), and reduced allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture. The dendritic cells were characterized by decrease of mature, activated CD25⁺ cells, low level of IFN γ production

in conjunction with enhanced capacity to produce IL-10 and IL-6, and profound reduction of functional (allostimulatory) activity. The APC dysfunction of were most prominent in PPD-anergic patients. A possible role of APC dysfunctions in disturbed antigen-specific T-cell response to *M. tuberculosis* is discussed. (*Med. Immunol.*, vol 11, N 2-3, pp 245-254)

Адрес для переписки:

Сахно Людмила Васильевна,
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
Тел.: (383) 228-21-01.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Введение

Важную роль в генерации адекватного иммунного ответа у больных туберкулезом легких (ТБ) играют антигенпрезентирующие клетки (АПК), представленные моноцитами, макрофагами (МФ) и дендритными клетками (ДК). Циркулирующие в периферической крови моноциты являются гетерогенной популяцией и различаются по морфологии, экспрессии мембранных антигенов и функциональным свойствам [26]. Большинство из них несут на своей поверхности высокий уровень CD14 (рецептор к липополисахариду) и не экспрессируют CD16 (Fcγ рецептор III типа) [12]. В то же время существует минорная субпопуляция моноцитов, которые одновременно коэкспрессируют CD14 и CD16 молекулы [28]. В крови здоровых доноров количество таких клеток составляет около 10% [29].

В сравнении с CD14⁺CD16⁻ моноцитами отличительной особенностью CD14⁺CD16⁺ клеток является более высокий уровень экспрессии мРНК и продукции TNFα в ответ на стимуляцию липополисахаридом (ЛПС) [4], вследствие чего их стали обозначать как «провоспалительные» моноциты [29]. Действительно, увеличение доли CD14⁺CD16⁺ моноцитов выявлено при многих инфекционных и воспалительных заболеваниях, включая ВИЧ-инфекцию, сепсис и системные аутоиммунные заболевания [7, 17, 27]. В то же время сведения о количественном содержании и функциональной активности субпопуляции CD14⁺CD16⁺ моноцитов при туберкулезе легких практически отсутствуют.

Хорошо известно, что инфицирование макрофагов и дендритных клеток *M. tuberculosis* сопровождается изменением их функциональных свойств [9, 10, 13]. Однако дефект данных типов АПК может быть обусловлен не только прямым воздействием микобактерии, но и нарушением процесса генерации МФ и ДК из моноцитов, которые рекрутируются в очаг туберкулезной инфекции из периферической крови больного. Функциональные свойства моноцитов и получаемых из них МФ и ДК у больных ТБ, особенно с учетом выраженности антигенспецифического Т-клеточного ответа, остаются во многом не исследованными.

Исходя из этого, настоящее исследование было предпринято с целью анализа фенотипических и функциональных свойств моноцитов крови, а также генерированных МФ/ДК и выяснения возможной роли дисфункций АПК в нарушении антигенспецифического ответа у больных туберкулезом легких.

Материалы и методы

В исследование были включены 192 больных туберкулезом легких: 125 мужчин (65,1%) и 67 женщин (34,9%) в возрасте от 20 до 64 лет, включая

68 пациентов (35,4%) с фиброзно-кавернозной, 100 пациентов (52,1%) с инфильтративной и 24 пациента (12,5%) с диссеминированной формами ТБ. Активное бацилловыделение (БК+) было выявлено у 123 больных (64,1%). При лабораторном исследовании лекарственная резистентность регистрировалась у 69 из 192 пациентов (35,9%). Обследование всех пациентов проводилось при получении информированного согласия. Контрольную группу составили 90 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина и культивировали (0,1 x 10⁶/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 °С в CO₂-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали туберкулиновый очищенный белковый дериват (PPD) в концентрации 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сутки по включению 3Н-тимидина (1 мкКи на лунку), добавленного за 18 ч до окончания культивирования. В зависимости от уровня пролиферативного ответа МНК на PPD больные были разделены на 2 подгруппы: подгруппа 1 – с сохранным (> 12500 имп/мин; n = 118) и подгруппа 2 – со сниженным (< 12500 имп/мин; n = 74) PPD-ответом.

Моноциты выделяли в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) путем прилипания к пластику МНК (3 x 10⁶ клеток/мл) в присутствии 5% сыворотки АВ (IV) группы. Макрофаги генерировали из прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах в среде RPMI-1640 дополненной 5% аутоплазмы, 2% сыворотки крови плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), 2-меркаптоэтанолом (5 x 10⁻⁵М, Serva), пируватом Na (2 x 10⁻³М, «Sigma-Aldrich»), 1% раствором незаменимых аминокислот в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF; 50 нг/мл, «Sigma-Aldrich») в течение 6 суток. По окончании культивирования отделение МФ от пластиковой поверхности осуществляли с использованием 0,25% раствора трипсина/ЭДТА. Полученные МФ 2-кратно отмывали средой RPMI-1640, дополненной 5% FCS.

ДК также генерировали из прилипающей фракции МНК в течение 4 суток в среде RPMI-1640 с 5% FCS в присутствии GM-CSF 40 нг/мл и IFNα (Роферон-А, Roche, Швейцария) 1000 Ед/мл с последующим дозреванием в течение 24 ч в присутствии 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС *E. coli* 0111:B4, «Sigma-Aldrich») [5, 16, 18, 21].

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Маркеры	Количество моноцитов (%)			
	Здоровые доноры	Больные ТБ		
		В целом по группе	Подгруппа № 1	Подгруппа № 2
CD14 ⁺ CD16 ⁺	8,9±1,2 (15)	18,0±1,2 (65)*	15,4±1,0 (39)*	21,4±2,4 (26)**
FasL ⁺	5,6±0,9 (17)	25,6±4,1 (29)*	21,3±4,6 (13)*	29,1±6,3 (16)*
HLA-DR ⁺	84,1±1,5 (10)	69,7±1,8 (72)*	69,8±2,2 (50)*	69,1±3,7 (22)*
CD86 ⁺	66,1±4,5 (9)	48,3±4,9 (18)*	48,6±5,4 (12)*	40,5±4,6 (6)*

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различия показателей по сравнению с донорами; # – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий в подгруппах у больных ТБ с сохранным (№ 1) и сниженным (№ 2) РPD-ответом. Здесь и далее в таблицах: U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни; в скобках – количество наблюдений.

Относительное содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, CD86 и FasL, определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием соответствующих FITC-меченых моноклональных антител (Becton Dickinson). Для определения субпопуляции CD14⁺CD16⁺ моноцитов использовали FITC-меченые анти-CD16 антитела (Сорбент, Москва) и фикоэритрин (PE)-меченые анти-CD14 антитела (PharMingen, США). Оценку поверхностных маркеров МФ и ДК проводили с использованием анти-CD14, -CD16, -HLA-DR, -CD86, -CD25, -CD83 антител, меченых различными флуорохромами (Сорбент и PharMingen).

Внутриклеточную экспрессию TNF и IL-10 также проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя пермеабиллизацию клеток. Относительное количество клеток, содержащих внутриклеточные детерминанты TNF α / β и IL-10, оценивали в моноцитарном гейте с помощью FITC-меченых антител 4F2, любезно предоставленных кандидатом медицинских наук С.В. Киселевым (США) и PE-меченых анти-IL-10 антител (Becton Dickinson).

Для того чтобы оценить секрецию цитокинов, моноциты снимали с пластиковой поверхности скребком, однократно отмывали и культивировали в 96-луночных планшетах (0,1 x 10⁶/лунку) 48 ч в стандартной среде с добавлением 10% FCS. Концентрацию IL-6, IL-10 в супернатантах определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы («Вектор-Бест», Новосибирск).

Продукцию TNF α , IL-6, IL-10, IFN γ и IL-18 оценивали в супернатантах 6-суточных культур МФ, а также в 24-часовых супернатантах МФ, не стимулированных и стимулированных ЛПС в дозе 10 мкг/мл. Концентрацию цитокинов определяли, используя соответствующие ИФА тест-системы производства «Вектор-Бест», Новосибирск (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-18) и «Цитокин»,

Санкт-Петербург (IL-10). Также определяли концентрацию цитокинов в супернатантах 5-суточных культур ДК.

Аллостимуляторную активность МФ и ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании МНК доноров (0,1 x 10⁶/лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии аллогенных МФ здоровых доноров или больных ТБ в соотношении 10:1. Интенсивность пролиферации оценивали на 5 сутки радиометрически по включению 3H-тимидина. Индекс стимуляции в СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии МФ к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0» для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные приведены в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (S.E.), а также в виде медианных значений (Median).

Результаты

Для оценки моноцитарного звена исследовали фенотипические маркеры, а также внутриклеточную продукцию TNF и IL-10 моноцитами крови больных ТБ и здоровых доноров (табл. 1). В группе доноров количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов варьировало от 2 до 17,3%, составляя в среднем 8,9±1,2%, что согласуется с данными литературы [29]. Относительное содержание CD14⁺CD16⁺-моноцитов у больных ТБ варьировало от 4 до 54% и в среднем в 2 раза превышало нормативный уровень. При этом наиболее выраженное увеличение доли CD14⁺CD16⁺ моноцитов отмечалось в подгруппе больных

со сниженным PPD-ответом. Частотный анализ показал, что в этой подгруппе у 61,5% больных (16/26) индивидуальные значения содержания CD14⁺CD16⁺ моноцитов выходили за верхнюю границу нормативного диапазона (> 17%), что достоверно превышало частоту встречаемости таких больных в оппозиционной подгруппе с сохранной PPD-реактивностью (25,6%, 10/39, $p_{\text{ТМФ}} = 0,04$).

В целом по группе обследованных больных ТБ регистрировалось значительное увеличение количества FasL-позитивных клеток, а также достоверное снижение числа моноцитов, экспрессирующих HLA-DR- и CD86-антигены. При этом статистически значимых различий по этим показателям в подгруппах больных, оппозиционных по уровню антигенспецифического ответа на PPD, выявлено не было. Поскольку CD16 и FasL относятся к активационным маркерам, увеличение в циркуляции моноцитов, экспрессирующих CD16 и FasL, может указывать на их активацию. В свою очередь, уменьшение доли HLA-DR⁺ и CD86⁺ моноцитов свидетельствует о нарушении экспрессии костимуляторных молекул, что может быть причиной дефекта антигенпрезентирующей функции моноцитов.

Анализ внутриклеточной экспрессии цитокинов показал (рис. 1), что по сравнению с донорами у больных ТБ регистрируется 3-кратное снижение относительного количества моноцитов, продуцирующих TNF α / β (с $14,7 \pm 2,1$ до $4,9 \pm 1,1\%$), а также увеличение числа клеток с внутриклеточной экспрессией IL-10 (с $1,06 \pm 0,34$ до $6,6 \pm 2,7\%$), что четко указывает на изменение регуляторной функции моноцитов при туберкулезной инфекции. Важно отметить, что между количеством CD14⁺CD16⁺ моноцитов и процентным содержанием TNF⁺ моноцитов выявлялась досто-

верная обратная корреляционная зависимость ($r_s = -0,62$; $p < 0,01$).

Цитокин-секреторную активность моноцитов дополнительно оценивали по продукции IL-6 и IL-10 в супернатантах 24-часовых спонтанных и ЛПС-стимулированных культурах доноров и больных ТБ, в том числе в зависимости от уровня антигенспецифического ответа на PPD. Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению с донорами моноциты больных ТБ отличались повышенной IL-6 и IL-10-секреторной активностью при стимуляции ЛПС ($p_U < 0,05$). При этом наиболее выраженное и статистически значимое усиление ЛПС-индуцированной продукции IL-6 и IL-10 регистрировалось в подгруппе пациентов со сниженным PPD-ответом.

Выявленные дисфункции моноцитов у больных ТБ позволяют предположить, что и свойства генерируемых из них МФ и ДК также могут быть изменены. С целью проверки данной гипотезы провели сравнительное исследование фенотипа, цитокин-секреторной и аллостимуляторной активности МФ/ДК здоровых доноров и больных ТБ, различающихся по уровню антигенспецифического ответа на PPD. Из данных таблицы 3 видно, что и у доноров, и у больных преобладающее большинство МФ (около 80%) экспрессировали CD14. Интересно отметить, что у больных с сохранным ответом на PPD около 50% полученных МФ экспрессировали CD16, что было достоверно выше, чем у доноров или у пациентов со сниженным PPD-ответом ($29 \pm 3,8$ и $30 \pm 4,2\%$ соответственно; $p_U < 0,05$). В то же время у пациентов с PPD-анергией обнаруживалось 2-кратное снижение доли CD86-позитивных клеток, а также умеренное, но статистически достоверное снижение количества HLA-DR⁺МФ,

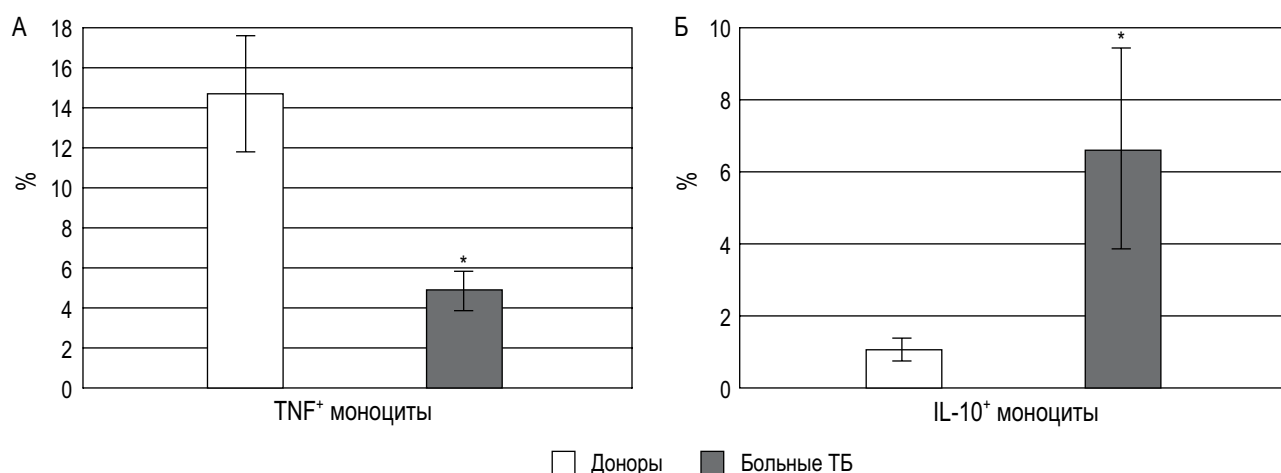


Рисунок 1. Внутриклеточная экспрессия TNF и IL-10 в моноцитах крови здоровых доноров и больных туберкулезом легких

Примечание. Представлены средние значения ($M \pm S.E.$) относительного количества моноцитов с внутриклеточной экспрессией TNF α / β (А) и IL-10 (Б) у здоровых доноров ($n = 8$) и больных ТБ ($n = 6$). * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с донорами.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ МОНОЦИТАМИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Исследуемый цитокин	Условия продукции	Уровень продукции цитокинов (пкг/мл)			
		Здоровые доноры (n = 8)	Больные ТБ		
			В целом по группе (n = 17)	Подгруппа № 1 (n = 8)	Подгруппа № 2 (n = 9)
IL-6	0	1509±781	2995±390	2748±756	3206±374
	ЛПС	1902±720	4015±315*	3596±708	4329±146*
IL-10	0	27±17	58,6±12,8	59,2±19,4	58,0±18,1
	ЛПС	70,1±40,9	201,5±44,7*	165,8±65,5	233,3±62,8*

Примечание. Представлены средние значения спонтанной (0) и ЛПС-стимулированной (ЛПС) продукции цитокинов в 24-часовых культурах моноцитов ($0,1 \times 10^6$ клеток/лунку) здоровых доноров и больных ТБ легких. Подгруппы № 1 и № 2 – больные ТБ с сохранным и сниженным ответом на PPD соответственно; * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий средних значений по сравнению с донорами.

тогда как в подгруппе PPD-реактивных больных относительное содержание $CD86^+$ и $HLA-DR^+$ клеток сохранялось на уровне нормы. Таким образом, МФ, генерируемые *in vitro* из моноцитов больных с сохранным антигенспецифическим ответом, практически не отличаются по своему фенотипу от МФ здоровых доноров, за исключением повышенного содержания $CD16^+$ клеток. Напротив, МФ, полученные из моноцитов PPD-анергичных больных, характеризовались количественным дефицитом клеток, экспрессирующих молекулы необходимые для эффективной презентации антигена ($HLA-DR$) и костимуляции Т-лимфоцитов ($CD86$).

Анализ уровня продукции цитокинов в 6-суточных культурах МФ не выявил значимых различий концентрации $TNF\alpha$, IL-6 и IL-18 в подгруппах здоровых доноров и больных ТБ. Тем не менее у больных ТБ как с сохранным, так и сниженным PPD-ответом регистрировалось 10-кратное снижение уровня $IFN\gamma$. Кроме того, макрофаги PPD-анергичных больных характеризовались 3-кратным увеличением уровня продукции IL-10 и достоверно отличались по этому показателю и от здоровых доноров, и от пациентов с сохранным PPD-ответом. Полученные результаты свидетельствуют о дисбалансе цитокинов, продуцируемых МФ больных ТБ, который проявляется недостаточностью продукции $IFN\gamma$, участвующего в запуске и контроле воспалительных и клеточно-опосредованных иммунных реакций. Цитокиновый дисбаланс у больных с PPD-анергией дополнительно усиливается за счет повышенной секреции IL-10, что может свидетельствовать об увеличении противовоспалительного и иммуносупрессорного потенциала генерированных *in vitro* МФ при нарушении антигенспецифического ответа на PPD.

Оценка аллостимуляторной активности МФ показала, что пролиферативный ответ

в алло-СКЛ, индуцированный макрофагами PPD-анергичных больных, был практически в 6 раз ниже, чем в аналогичных культурах, содержащих МФ здоровых доноров ($p_0 < 0,05$). Важно отметить, что аллостимуляторная активность МФ больных с сохранным PPD-ответом не отличалась от нормативных значений.

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). Из данных таблицы 4 видно, что МФ, генерированные из моноцитов больных с сохранным ответом на PPD (подгруппа № 1), в целом сохраняют свою цитокин-секреторную функцию и продуцируют про- ($TNF\alpha$, IL-6) и противовоспалительные (IL-10) медиаторы на уровне, сопоставимом с донорскими значениями. В то же время регистрировалось снижение интенсивности спонтанной и особенно ЛПС-стимулированной продукции $IFN\gamma$. Тем не менее макрофаги PPD-отвечающих больных отличались максимально высоким уровнем спонтанной секреции IL-18, и при этом были чувствительны к стимуляции эндотоксином. Вероятно, способность клеток к продукции IL-18, выявленная в данной подгруппе больных ТБ, частично компенсирует дефицит секреции $IFN\gamma$ и позволяет сохранять аллостимуляторную активность МФ в СКЛ (табл. 3), а также общую PPD-реактивность МНК в культуре *in vitro*.

Низкая аллостимуляторная активность МФ, генерированных из моноцитов больных со сниженным ответом на PPD (табл. 3), сочеталась с наиболее выраженными нарушениями их цитокин-секреторной функции, которые проявлялись снижением спонтанной

и ЛПС-индуцированной продукции $IFN\gamma$ и IL-18 в комбинации с повышенным уровнем продукции IL-6 (спонтанно) и IL-10 (в ответ на ЛПС).

Был проведен также сравнительный анализ фенотипических и функциональных свойств ДК, генерированных из моноцитов крови доноров и больных ТБ (табл. 5). Несмотря на отсутствие значимых различий в количестве зрелых $CD83^+$ ДК в группах больных, умеренное снижение $HLA-DR^+$ ДК в сочетании с достоверным увеличением $CD14^+$ -позитивных клеток и низким количеством активированных $CD25^+$ ДК у больных ТБ свидетельствует о нарушении процесса созревания/генерации ДК при туберкулезной инфекции, особенно в подгруппе PPD-ареактивных больных.

Оценка содержания цитокинов в супернатантах 5-суточных культур ДК показала, что по сравнению с донорами ДК генерированные из моноцитов больных с сохранным PPD-ответом отличались повышенной продукцией IL-6 и резко сниженным уровнем синтеза $IFN\gamma$. В оппозиционной подгруппе PPD-анергичных больных также отмечался глубокий дефицит продукции $IFN\gamma$. Однако в этом случае генерируемые ДК, так же как и исходная популяция моноцитов (табл. 2) и получаемые из них макрофаги (табл. 3), характеризовались повышенной IL-10-секреторной активностью ($p < 0,05$).

При исследовании аллостимуляторной активности было обнаружено, что способность ДК больных ТБ стимулировать пролиферативный ответ

в СКЛ достоверно ниже, чем у ДК здоровых доноров. Характерно, что наиболее глубокий дефект аллостимуляторной активности ДК регистрировался в подгруппе PPD-анергичных пациентов.

Обсуждение

В целом полученные нами данные убедительно свидетельствуют о том, что у больных ТБ изменены все три типа АПК. На уровне моноцитов это проявляется снижением экспрессии $CD86$ и $HLA-DR$ молекул, увеличением субпопуляции $CD14^+CD16^+$ клеток, $FasL^+$ и IL-10⁺ моноцитов, а также повышенной продукцией IL-10 и IL-6 в ответ на стимуляцию эндотоксином. На уровне макрофагов регистрируется дисбаланс продукции Th1/Th2-цитокинов ($IFN\gamma$, IL-18/IL-6, IL-10), а также снижение аллостимуляторной активности. На уровне ДК это проявляется снижением количества зрелых активированных $CD25^+$ клеток, дефицитом продукции $IFN\gamma$ в сочетании повышенной способностью секретировать IL-10 и IL-6 и, так же как у макрофагов, снижением аллостимуляторной активности. При этом наиболее выраженные изменения свойств различных типов АПК регистрируются в подгруппе больных ТБ со сниженным пролиферативным ответом на антигены *M. tuberculosis* (PPD).

Изменение фенотипических и функциональных свойств моноцитов является характерным признаком туберкулезной инфекции. Так, полученные нами данные о снижении относительного количества $HLA-DR$ и $CD86$ -позитивных моноцитов согласуются с данными других исследова-

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Показатели	Здоровые доноры	Больные ТБ	
		Подгруппа № 1	Подгруппа № 2
1. Фенотип клеток (%)			
CD14 ⁺	78±3,9 (18)	79±4,1 (11)	76±4,0 (9)
CD16 ⁺	29±3,8 (18)	50±5,6 (11)*	30±4,2 (9) [#]
HLA-DR ⁺	91±2,2 (18)	96±1,7 (11)	80±4,8 (9) ^{**}
CD86 ⁺	38±4,7 (18)	31±9,4 (11)	19±3,9 (9)*
2. Продукция цитокинов (пкг/мл)			
TNF α	557±95 (14)	508±120 (11)	399±83 (14)
IL-6	2119±39 (10)	1820±220 (7)	1645±291 (6)
IL-10	53±22 (13)	54±24 (10)	162±58 (7) ^{**}
IFN γ	2588±1232 (5)	315±104 (8)*	221±109 (4)*
IL-18	41±6,7 (7)	44±10 (8)	62±15 (5)
3. Аллостимуляторная активность в СКЛ			
Пролиферативный ответ (имп/мин)	13798±208 (31)	10072±1158 (33)	2154±653 (10) ^{**}
Индекс стимуляции	18,0±3,1 (31)	18,0±3,1 (33)	4,3±1,0 (10) ^{**}

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с донорами; * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий в подгруппах у больных ТБ с сохранным (№ 1) и сниженным (№ 2) PPD-ответом.

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В 24-ЧАСОВЫХ КУЛЬТУРАХ МАКРОФАГОВ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Цитокин	Условия продукции	Уровень продукции цитокинов (пкг/мл)					
		Здоровые доноры		Больные ТБ			
				Подгруппа № 1		Подгруппа № 2	
		Концентрация	ИВлпс	Концентрация	ИВлпс	Концентрация	ИВлпс
TNF α	0	85,4 (5)		198 (6)		295 (3)	
	ЛПС	940 (5)	4,5	940 (6)	4,2	814 (3)	2,3
IL-6	0	734 (7)		691 (9)		1219 (4)*	
	ЛПС	2180 (7)	3,0	2111 (9)	3,0	2212 (4)	1,8 *
IL-10	0	1,3 (8)		1,3 (8)		1,8 (8)	
	ЛПС	8,5 (8)	6,1	12,2 (8)	5,7	22,3 (8)*	7,2
IFN γ	0	134 (5)		89,5 (4)		34 (3)*	
	ЛПС	326 (5)	2,5	80,5 (4)*	1,3*	38 (3)*	1,1 *
IL-18	0	16,9 (5)		34,4 (6)*		8,1 (3)**	
	ЛПС	27,3 (5)	1,6	53,3 (6)	1,5	8,6 (3)**	1,0

Примечание. Представлены медианные значения спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов в 24-часовых культурах МФ (0,05 x 10⁶ МФ/лунку) здоровых доноров и больных ТБ. ИВлпс – индекс влияния ЛПС; * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий средних значений по сравнению с донорами; * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий средних значений в подгруппах у больных ТБ с сохранным (№ 1) и сниженным (№ 2) PPD-ответом.

телей о нарушении экспрессии костимуляторных молекул на моноцитах больных ТБ [25].

Кроме того, в периферической крови больных ТБ нами выявлено увеличение относительного содержания CD14⁺CD16⁺ моноцитов, которое в наибольшей степени проявлялось у пациентов со сниженным антигенспецифическим ответом. Субпопуляция CD14⁺CD16⁺ моноцитов и их свойства у больных ТБ практически не исследованы. Единственным сообщением является работа Vanham G. с соавторами, которые выявили при туберкулезной инфекции повышенную экспрессию на моноцитах Fc γ R I и III типа [24]. Важно отметить, что у здоровых доноров CD14⁺CD16⁺ моноциты экспрессируют мРНК TNF α , IL-1 и IL-6, но не IL-10 [4, 29]. Кроме того, количество CD14⁺CD16⁺ моноцитов при многих заболеваниях ассоциировано с активностью воспалительного процесса [22]. Поэтому общепринятым стало мнение, что данная субпопуляция представлена клетками с провоспалительной активностью. Тем не менее результаты, полученные нами при обследовании больных ТБ, противоречат такому представлению. Так, нами выявлена обратная корреляционная взаимосвязь ($r_s = -0,62$; $p < 0,01$) между количеством CD14⁺CD16⁺ клеток и процентным содержанием моноцитов с внутриклеточной экспрессией TNF. Кроме того, ранее при исследовании внутриклеточной продукции IL-10 в субпопуляциях CD16⁺ и CD16-моноцитов нами было показано, что у больных ТБ IL-10-позитивные клетки сосредоточены преимущественно в популяции CD16⁺ моноцитов,

при этом среднее количество IL-10⁺CD16⁺ клеток было значительно выше, чем у здоровых доноров (12,1 \pm 3,1 против 2,0 \pm 0,92%, $p_U < 0,05$) [1]. Очевидно, повышенное содержание моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10 (рис. 1) при туберкулезной инфекции является совокупным результатом увеличения как общего числа CD14⁺CD16⁺ моноцитов, так и доли IL-10-позитивных клеток среди них. Таким образом, у больных туберкулезом CD14⁺CD16⁺ моноциты, по-видимому, представляют субпопуляцию клеток с противовоспалительной/иммуносупрессорной активностью.

Подтверждением иммуносупрессорных свойств моноцитов у больных ТБ является их повышенная способность к продукции IL-6 и IL-10 в ответ на стимуляцию эндотоксином (табл. 2). При этом в наибольшей степени такая функциональная активность моноцитов была характерна для пациентов со сниженным PPD-ответом. Усиление супрессорной активности моноцитов при туберкулезной инфекции является известным фактом и активно обсуждается в качестве одной из причин нарушения иммунного ответа на антигены *M. tuberculosis* [8, 19, 25].

Одним из открытых остается вопрос, с чем связано увеличение числа CD14⁺CD16⁺ моноцитов у больных ТБ. В литературе имеются данные, что появление CD16-антигена на моноцитах крови индуцируется определенными цитокинами (TGF β и IL-10) [29]. Эти же цитокины активируют моноциты/макрофаги по альтернативному пути, в результате чего клетки приобретают

ТАБЛИЦА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Показатели	Здоровые доноры	Больные ТБ	
		Подгруппа № 1	Подгруппа № 2
1. Фенотип клеток (%)			
CD14 ⁺	8,7±1,4 (18)	17,2±2,7 (28) *	30,0±5,4 (10)*#
CD25 ⁺	25,1±3,5 (18)	8,8±1,3 (28) *	12,1±2,9 (10)*
HLA-DR ⁺	90,7±3,6 (18)	83,3±3,7 (28)	77,3± 5,8 (10)
CD83 ⁺	29,4±2,9 (18)	34,2±3,7 (28)	27,8±3,4 (10)
2. Продукция цитокинов (пкг/мл)			
TNF α	818±63 (13)	945±51 (14)	912±45 (7)
IL-6	9767±1245 (20)	13468±859 (35)*	10685±1953 (8)
IL-10	73±14,8 (8)	191±84 (11)	421±107 (7)*
IFN γ	111±59,8 (13)	19,5±2,1 (23)*	13,9±3,7 (6)*
IL-18	6,7±3,0 (19)	20,0±6,7 (35)	26,7±21,5 (8)
3. Аллостимуляторная активность в СКЛ			
Пролиферативный ответ (имп/мин)	12113±1263 (24)	6173±1126 (31)*	1983±366 (24)*#
Индекс стимуляции	11,0±0,8 (24)	8,6±1,2 (31)*	4,0±0,7 (24)*#

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$ * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий показателей по сравнению с донорами; * – $p_U < 0,05$ – достоверность различий в подгруппах у больных ТБ с сохранным (№ 1) и сниженным (№ 2) PPD-ответом.

противовоспалительные/иммуносупрессорные свойства [11, 23]. Поскольку инфицирование АПК *M. tuberculosis* сопровождается запуском продукции TGF β и IL-10 [6, 13, 20], а развитие туберкулезной инфекции сопряжено с Th1→Th2 переключением [16, 25], то увеличение популяции CD14⁺CD16⁺ моноцитов у больных ТБ, возможно, является результатом активации моноцитов в условиях сдвига цитокинового баланса в сторону противовоспалительных/иммуносупрессорных медиаторов.

Выявленные дисфункции циркулирующих моноцитов у больных ТБ позволили предположить, что и свойства получаемых из них МФ и ДК также могут быть изменены. Действительно, нами показано, что МФ больных ТБ отличаются от клеток здоровых доноров по целому комплексу фенотипических и функциональных признаков, которые четко ассоциируются с выраженностью антигенспецифического ответа на PPD. Так, например, МФ, полученные из моноцитов PPD-анергичных больных, характеризовались количественным дефицитом клеток, экспрессирующих HLA-DR и костимуляторные молекулы (CD86). Вне зависимости от уровня PPD-ответа МФ больных ТБ отличались низким уровнем продукции IFN γ , а у PPD-анергичных пациентов – в сочетании с повышенной IL-10-секреторной активностью. Пролиферативный ответ в алло-СКЛ, индуцированный макрофагами PPD-анергичных больных, был достоверно ниже, чем в аналогичных куль-

турах, содержащих МФ здоровых доноров или PPD-реактивных пациентов (табл. 3).

В популяции ДК, генерированных из моноцитов крови больных ТБ, нами также были выявлены фенотипические отличия (очевидно, связанные с задержкой созревания/генерации ДК), а также изменения их функциональных свойств, которые проявлялись дисбалансом продукции Th1/Th2-цитокинов и низкой аллостимуляторной активностью (табл. 5). Важно отметить, что отдельные нарушения ДК четко ассоциировались с угнетением антигенспецифического ответа, поскольку выявлялись или были более выражены в подгруппе больных с PPD-анергией.

Таким образом, общим функциональным дефектом всех трех проанализированных нами типов АПК (циркулирующих моноцитов и генерированных из них МФ/ДК) является нарушение их цитокин-секреторной активности: дефицит продукции IFN α в сочетании с повышенной способностью секретировать IL-10 и IL-6.

Общепризнанно, что уничтожение внутриклеточных микроорганизмов (например, *M. tuberculosis*) реализуется с вовлечением 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 дисбаланс продукции Th1/Th2-цитокинов (IFN γ , IL-18/IL-6, IL-10), который характерен для

АПК больных ТБ, по-видимому, является одной из причин неэффективности антигенспецифического ответа при туберкулезной инфекции (PPD-анергии). Действительно, хорошо известно, что IL-6 способен вызывать поляризацию наивных CD4⁺T-лимфоцитов в сторону Th2, а IL-10 является ингибитором Th1-клеток [10]. В качестве дополнительного механизма развития PPD-анергии у больных ТБ ответа можно также рассматривать и снижение экспрессии HLA-DR и костимуляторных молекул на АПК, что приводит к нарушению их антигенпрезентирующей функции. Именно в подгруппе PPD-анергичных больных нами было выявлено наиболее глубокое угнетение аллостимуляторной активности МФ/ДК.

Тем не менее, снижение продукции IFN γ было характерно для всех больных ТБ легких независимо от уровня PPD-ответа. Можно предположить, что нарушение антигенспецифического ответа у больных ТБ может быть связано не только с дефицитом продукции Th1-цитокинов, но и с приобретением толерогенных свойств АПК (МФ/ДК), например, через аутокринные механизмы под влиянием активно продуцируемого ими IL-10. Известно, что толерогенные ДК способствуют генерации регуляторных CD4⁺T-клеток с супрессорной активностью (Treg) [14]. Действительно, ранее нами было показано, что у больных ТБ с PPD-анергией повышено содержание циркулирующих CD4⁺CD25⁺Treg, при этом между уровнем PPD-ответа и количеством CD4⁺CD25⁺T-клеток регистрировалась сильная обратная корреляционная связь ($r_s = -0,81$; $p < 0,01$) [2].

В целом полученные данные, а также результаты проведенных нами ранее исследований свидетельствуют о том, что в основе неэффективного иммунного ответа на антигены *M. tuberculosis* (PPD-анергии), который обнаруживается примерно у 40% больных туберкулезом легких, лежат комплексные механизмы, связанные не только с повышенным апоптозом/анергией Т-клеток [3] или генерацией Treg [2], но и с нарушением функциональной активности АПК (моноцитов, МФ, ДК). В настоящей работе мы исследовали МФ/ДК, которые не имели непосредственного контакта с патогеном, а были получены в культуре *in vitro* из моноцитов периферической крови больных ТБ. Поэтому выявленные дисфункции МФ/ДК, скорее всего, являются результатом изменения свойств циркулирующих моноцитов, нежели следствием инфицирования клеток *M. tuberculosis*. Полученные результаты отражают общую направленность возможных нарушений АПК при ТБ, но не претендуют на исчерпывающее представление о патогенезе развития дисфункций АПК в очаге туберкулезного поражения. Можно полагать, что изменения АПК,

формирующиеся непосредственно в патологически измененной ткани легкого, носят более выраженный характер, чем те, что выявлены нами на основании экспериментов *in vitro*.

Список литературы

1. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Кожевников В.С., Сенюков В.В., Пронкина Н.В., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Фенотипическая и функциональная характеристика моноцитов у больных туберкулезом легких // Мед. иммунол. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 49-56.
2. Сахно Л.В., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Никонов С.Д., Жданов О.А., Мостовая Г.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких // Пробл. туб. — 2004. — № 5. — С. 23-27.
3. Черных Е.Р., Сахно Л.В., Хонина Н.А., Тихонова М.А., Кожевников В.С., Никонов С.Д., Жданов О.А., Останин А.А. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу, у больных туберкулезом легких // Пробл. туб. — 2002. — № 7. — С. 43-48.
4. Belge K.U., Dayyani F., Horelitz A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺ DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF // J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 3536-3542.
5. Bella S.D., Nicola S., Riva A., Biasi N.M., Clerici M., Villa M.L. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interferon- α // J. Leukoc. Biol. — 2001. — Vol. 75. — P. 106-116.
6. Beltan E., Horgen L., Rastogi N. Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria // Microb. Pathog. — 2000. — Vol. 28. — P. 313-318.
7. Dayyani F., Belge K.U., Frankenberger M., Mack M., Berki T., Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14⁺CD16⁺ monocytes // J. Leukoc. Biol. — 2003. — Vol. 74. — P. 33-39.
8. Fietta A., Meloni F., Francioli C., Morosini M., Bulgheroni A., Casali L., Gialdroni G.G. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* affects interleukin-monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-10 production by human mononuclear phagocytes // Int. J. Tissue React. — 2001. — Vol. 23. — P. 113-125.
9. Geijtenbeek T.B.H., van Vliet S.J., Koppel E.A., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Appelmelk B., van Kooyk V. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 197. — P. 7-17.

10. Giacomini E., Iona E., Ferroni L., Miettinen M., Fattoni L., Orefici G., Julkunen I., Coccia E.M. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T-cell response // *J. Immunology*. — 2001. — Vol. 166. — P. 7033-7041.
11. Gordon S. Alternative activation of macrophages // *Immunology*. — 2003. — Vol. 3. — P. 23-35.
12. Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., Flad H.D., Ernst M. Phenotypical and functional characterization of Fc γ receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity // *Eur. J. Immunol.* — 1993. — Vol. 23. — P. 3126-3135.
13. 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. — Vol. 168. — P. 4636-4642.
14. Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H. Induction of Interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T-cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192. — P. 1213-1222.
15. Luft T., Pang K.C., Thomas E., Hertzog P., Hart D.N., Trapani J., Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161. — P. 1947-1953.
16. Nagabhushanam V., Solache A., Ting L.-M., Escaron C.J., Zhang J.Y., Ernst J.D. Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN γ // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 171. — P. 4750-4757.
17. Nockher W.A., Scherberich J.E. Expanded CD14⁺CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis // *Infect. Immun.* — 1998. — Vol. 66. — P. 2782-2790.
18. Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Pucchio T.D., Logozzi M., Spada M., Giammarioli A.M., Malorni W., Eais S., Belardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3 β and Th1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells — importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood*. — 2001. — Vol. 98. — P. 3022-3029.
19. Pereira C.B., Palaci M., Leite O.H., Duarte A.J., Benard G. Monocyte cytokine secretion in patients with pulmonary tuberculosis differs from that of healthy infected subjects and correlates with clinical manifestations // *Microbes. Infect.* — 2004. — Vol. 6. — P. 25-33.
20. Rojas R.E., Balaji K.N., Subramanian A., Boom W.H. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67. — P. 6461-6472.
21. Santini S.M., Pucchio T.D., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells // *Stem. cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 357-362.
22. Scherberich J.E., Nockher W.A. CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory system diseases and monitoring immunosuppressive therapy // *Scand. J. Immunol.* — 2002. — Vol. 55. — P. 629-638.
23. Tzachanis D., Berezovskaya A., Nadler L.M., Boussiotis V.A. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses // *Blood*. — 2002. — Vol. 99. — P. 1465-1473.
24. Vanham G., Edmonds K., Qing L., Hom D., Toossi Z., Jons B., Daley C.L., Huebler B., Kestens L., Gigase P., Ellner J.J. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection // *Clin. Exp. Immunol.* — 1996. — Vol. 103. — P. 30-34.
25. Vanham G., Toossi Z., Hirsch C.S., Wallis R.S., Schwander S.K., Rich E.A., Ellner J.J. Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy // *Tubercle and Lung Disease*. — 1997. — Vol. 78. — P. 145-158.
26. Wang S.Y., Mak K.L., Chen L.Y., Chou M.P., Ho C.K. Heterogeneity of human blood monocytes: two subpopulations with different sizes, phenotypes and function // *Immunol.* — 1992. — Vol. 77. — P. 298-303.
27. Wijngaarden S., van Rooij J.A.G., Bijlsma J.W.J., van de Winkel J.G.J., Lafeber F.P.J. Fc γ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patient with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs // *Rheumatol.* — 2003. — Vol. 42. — P. 681-688.
28. Ziegler-Heitbrock H.W., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelter F., Schutt C., Passlick B., Pforte A. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages // *Eur. J. Immunol.* — 1993. — Vol. 23. — P. 2053-2058.
29. Ziegler-Heitbrock H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: CD14⁺CD16⁺ subpopulation // *Immunol. Today*. — 1996. — Vol. 17. — P. 424-428.

поступила в редакцию 09.02.2009

отправлена на доработку 14.02.2009

принята к печати 02.03.2009