

# ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

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.

НИИ клинической иммунологии СО РАМН,

\* Городская клиническая специализированная туберкулезная больница №1, Новосибирск, Россия

**Резюме.** В работе исследовано состояние моноцитарного звена у больных туберкулезом легких. Установлено, что в периферической крови больных выявляется 2-кратное увеличение относительного содержания CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов. Повышенное количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток сопряжено со снижением доли моноцитов с внутриклеточной экспрессией TNF $\alpha$ / $\beta$ . Причем между количеством CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и TNF<sup>+</sup> моноцитов обнаружена обратная корреляция. Напротив, увеличение субпопуляции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток у больных ТБ было ассоциировано с повышенным содержанием IL-10-позитивных моноцитов. Показано, что моноциты с внутриклеточной экспрессией IL-10 сосредоточены преимущественно в популяции CD16<sup>+</sup> моноцитов, что свидетельствует о возможной супрессорной активности CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток. Действительно, среднее количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток и частота встречаемости больных с повышенным их содержанием (>17%) достоверно выше у больных с нарушенным антигенспецифическим ответом. Увеличение CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов не связано с сопутствующей вирусной или неспецифической бактериальной инфекцией и выявляется у больных с активной формой туберкулеза независимо от формы и распространенности туберкулезного процесса.

**Ключевые слова:** CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты, внутриклеточные цитокины, PPD-анергия, туберкулез легких.

*Sakhno L.V., Tihonova M.A., Kozhevnikov V.S., Senjukov V.V., Pronkina N.V., Nikonov S.D.,  
Zhdanov O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.*

## THE PHENOTYPE AND FUNCTION OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

**Abstract.** Peripheral blood monocytes were investigated in the patients with pulmonary tuberculosis. It was established that population of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes was twofold increased in the patients with tuberculosis. The higher level of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes was associated with decreasing number of monocytes with intracellular TNF- $\alpha$ , and negative correlation between these parameters was revealed. On the contrary, the higher level of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes was connected with increased number of IL-10 producing monocytes. IL-10-producing cells were established mainly in the population of CD16<sup>+</sup> monocytes and so population of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes may represent the cells with suppressive activity. Really, the CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes were increased in patients with defective antigen specific response. Enhancement of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes was observed in patients with active tuberculosis independently of form and dissemination of disease and did not connected with concomitant viral or bacterial infection. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 1, pp 49-56)

### Адрес для переписки:

Черных Е.Р., 630099, Новосибирск, ул.  
Ядринцевская, д.14,  
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.  
Тел.: 3832-28-21-01, факс 3832-22-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru

### Введение

Моноциты, являясь составной частью системы мононуклеарных фагоцитов, играют важную роль в иммунной регуляции и защите от патогенной флоры. В периферической крови моноциты представлены гетерогенной популяцией и различаются по

морфологии, экспрессии мембранных антигенов и функциональным свойствам [21]. Большинство циркулирующих моноцитов несут на своей поверхности высокий уровень CD14 (рецептор к липополисахариду) и не экспрессируют CD16 (Fcγ рецептор III типа) [8]. В то же время существует минорная субпопуляция моноцитов, которые одновременно с CD14 ко-экспрессируют CD16 антигены [23]. В периферической крови здоровых доноров доля таких клеток составляет около 10% от всех циркулирующих моноцитов [24].

Поскольку CD16 экспрессируется при культивировании моноцитов *in vitro*, ряд авторов полагает, что появление CD16 может отражать состояние активации моноцитов. Кроме того, более высокий уровень антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости и низкий уровень CD11b, CD33 и CD64 позволяет рассматривать CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетки, как популяцию более зрелых моноцитов со свойствами тканевых макрофагов [23]. Еще одной особенностью CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> у здоровых доноров является более высокий уровень мРНК и продукции TNFα при стимуляции LPS по сравнению с популяцией CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов [4], вследствие чего CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты получили название «провоспалительных» моноцитов [24]. Действительно, увеличение доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов выявлено при многих инфекционных и воспалительных заболеваниях, включая ВИЧ-инфекцию, сепсис и системные воспалительные заболевания аутоиммунной природы [5, 7, 13, 22]. Причем проведение противовоспалительной терапии приводит к снижению количества этих клеток [5, 15, 22, 24].

При туберкулезной инфекции моноциты периферической крови с одной стороны характеризуются признаками активации, а с другой – выраженными нарушениями регуляторной активности, что рассматривается в качестве одной из причин дефекта антигенспецифического Т-клеточного ответа [19, 20]. В то же время сведения о количественном содержании и функциональной активности субпопуляции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов при данной патологии практически отсутствуют.

Исходя из этого, в настоящем исследовании мы попытались охарактеризовать фенотипические и функциональные свойства моноцитов периферической крови у больных туберкулезом легких (ТБ) и выяснить возможную роль CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в нарушении антигенспецифического ответа.

## Материалы и методы

Иммунологические исследования были проведены в группе 68 больных туберкулезом легких: 47 (69%) мужчин и 21 (31%) женщина в возрасте от 19 до 64 лет. Обследованная группа включала 23 (33,8%) пациента с фиброзно-кавернозной, 36

(52,9%) пациентов с инфильтративной и 9 (13,2%) – с диссеминированной формами туберкулеза. Активное бактериальное выделение было выявлено у 62 больных (БК<sup>+</sup> в 91% случаев). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров крови (с положительной кожной туберкулиновой пробой), однородных по полу и возрасту с больными туберкулезом легких исследуемой группы. Обследование всех пациентов проводилось при получении информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина. МНК (0,1x10<sup>6</sup>/лунку) культивировали 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 сывороткой доноров крови IV (AB) группы при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали очищенный туберкулин (PPD) в концентрации 50 мкг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали на 6 сутки по включению <sup>3</sup>H-тимидина, добавленного за 18 ч до окончания культивирования. Продукцию IFNγ в 48-часовых супернатантах PPD-стимулированных МНК оценивали методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческой тест-системы в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, CD86 молекулы и FasL определяли методом проточной цитофлуориметрии на лазерном клеточном сортире-анализаторе FACS Calibur («Becton Dickinson», США) с использованием соответствующих FITC-меченых моноклональных антител (Becton Dickinson). Для определения субпопуляции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов использовали FITC-меченные анти-CD16 антитела («Сорбент», Москва) и фикоэритрин (PE)-меченые анти-CD14 антитела (Phar-Mingen, San Diego, США).

Оценку внутриклеточной экспрессии IL-10 проводили методом проточной цитофлуориметрии. Клетки лейкоцитарной взвеси обрабатывали FITC-мечеными анти-CD16 моноклональными антителами и фиксировали 1% раствором параформальдегида. Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием 0,2% раствора Твин-20. Для выявления внутриклеточных детерминант IL-10 клетки обрабатывали PE-мечеными анти-IL-10 моноклональными антителами (Becton Dickinson). Относительное количество CD16<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> моноцитов оценивали методом двцветной проточной цитометрии. Определение относительного количества моноцитов, продуцирующих TNF проводили аналогично, оценивая количество в моноцитарном облаке клеток, содержащих внут-

рикеточные детерминанты TNF- $\alpha/\beta$ , и используя для их выявления соответствующие FITC-меченные моноклональные антитела 4F2, любезно предоставленные к.м.н. С.В. Киселевым (США).

Математическую обработку полученных результатов проводили методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0».

## Результаты

Для оценки состояния моноцитарного звена были исследованы фенотипические маркеры, а также внутриклеточная продукция TNF и IL-10 моноцитами периферической крови больных ТБ и здоровых доноров. Результаты сравнительного иммунологического исследования приведены в табл. 1.

У здоровых доноров процентное содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов варьировало от 2 до 17,3%, составляя в среднем  $8,9 \pm 1,2\%$ , что согласуется с данными литературы. У больных ТБ относительное количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в периферической крови было достоверно выше. Содержание этих клеток колебалось от 4 до 54% и в среднем более чем в 2 раза превышало нормативный уровень. Причем выраженное увеличение доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов, при котором индивидуальные значения их количества выходили за верхнюю границу нормативного диапазона (>17%), было выявлено у 31 из 65 обследованных больных ТБ (в 47,7 % случаев).

Кроме того, анализ экспрессии FasL на моноцитах показал достоверное увеличение у больных ТБ процентного содержания FasL-позитивных клеток. Вместе с тем количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR и CD86 антигены, было достоверно снижено. Как известно CD16 и FasL относятся к разряду активационных маркеров. Поэтому увеличение в периферической крови моноцитов, экспрессирующих CD16 и FasL могло быть результатом активации моноцитов. При этом уменьшение у больных доли HLA-DR<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> моноцитов свидетельствует о нарушении экспрессии ко-стимуляторных молекул и может быть причиной дефекта антиген-презентирующей функции моноцитов.

Исследование внутриклеточной продукции цитокинов выявило значимое снижение у больных относительного количества моноцитов, продуцирующих TNF, а также существенное увеличение моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10, что явно указывает на изменение регуляторной функции моноцитов. Причем, если в периферической крови здоровых доноров преобладают моноциты с внутриклеточным TNF, то у больных ТБ регистрируется сдвиг в сторону клеток, продуцирующих IL-10, т.е. обладающих иммуносупрессорной активностью.

Согласно данным Belge K.U. с соавторами, у здоровых доноров субпопуляция CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов является мощным источником продукции TNF $\alpha$  [4]. Действительно, сравнительный анализ больных ТБ, различающихся по степени активности воспалительного процесса, показал, что несмотря на близкие средние значения CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов (соответственно  $24 \pm 3$ ,  $n=10$  и  $18 \pm 1,5\%$ ,  $n=23$ ) в подгруппе с более выраженным воспалительным ответом (лейкоцитоз  $>10 \times 10^9/\text{л}$  и СОЭ  $>30$  мм/ч) частота встречаемости пациентов с высоким (>17%) содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов была достоверно выше, чем в оппозитной подгруппе ( $90$  vs  $35\%$ ;  $\chi^2=0,0035$ ). Однако по сравнению с донорами количество TNF-позитивных клеток в обеих подгруппах оставалось сниженным (соответственно  $8,6 \pm 3,5$  и  $3,7 \pm 0,8$  vs  $14,7 \pm 2,1\%$  у доноров,  $p<0,05$ ). Более того, между количеством CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов и процентным содержанием TNF<sup>+</sup> моноцитов выявлялась достоверная обратная корреляционная зависимость (Рис.1). В то же время важно отметить, что больные ТБ характеризовались не только увеличением доли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток, но и повышенным содержанием IL-10-позитивных моноцитов (см. табл. 1).

Чтобы проанализировать, являются ли CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты непосредственными продуцентами IL-10, далее была исследована внутриклеточная продукция IL-10 в субпопуляциях CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>-</sup> моноцитов у больных ТБ и здоровых доноров (Табл. 2). Как видно, у здоровых доноров IL-10-продуцирующие клетки в популяции CD16<sup>-</sup> моноцитов практически не обнаруживались, а в популяции CD16<sup>+</sup> моноцитов составляли в среднем 2%. У обследован-

Табл. 1. МОНОЦИТАРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ГРУППАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Количество моноцитов (%)	Доноры	Больные ТБ
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	$8,9 \pm 1,2$ (15)	$18,0 \pm 1,2$ (65) *
FasL <sup>+</sup>	$5,1 \pm 1,0$ (14)	$24,5 \pm 5,4$ (16) *
HLA-DR <sup>+</sup>	$84,1 \pm 1,5$ (10)	$71,4 \pm 1,8$ (68) *
CD86 <sup>+</sup>	$66,1 \pm 4,5$ (9)	$47,3 \pm 5,6$ (12) *
С внутриклеточной экспрессией TNF	$14,7 \pm 2,1$ (8)	$4,9 \pm 1,1$ (32) *
С внутриклеточной экспрессией IL-10	$1,06 \pm 0,34$ (8)	$6,6 \pm 2,7$ (6) *

Примечание: \*  $p_u < 0,05$  - достоверность различия показателей по сравнению с донорами. Здесь и далее в таблицах: U – непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни; в скобках – количество наблюдений

Табл.2. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ IL-10 В СУБПОПУЛЯЦИЯХ CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> И CD16<sup>+</sup> МОНОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ТБ

Группы / №№	Субпопуляции моноцитов (%)		
	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	IL-10 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	IL-10 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
Доноры			
1	17	5,5	0,19
2	10	5,46	0,27
3	6	4,45	0,28
4	2,6	0	0,13
5	15	0	0
6	4	0,18	1,03
7	4	0,14	0,47
8	7	0,34	0
M ± S.E.	8,2 ± 1,9	2,0 ± 0,92	0,3 ± 0,12
Больные ТБ			
1	16	12,6	1,14
2	33	8,8	0,11
3	15	13,9	2,5
4	54	3,1	0,15
5	31	22,2	0,42
M ± S.E.	29,8 ± 7 *	12,1 ± 3,1 *	0,86 ± 0,45

Примечание: \* -  $p_0 < 0,05$ , достоверность различия средних значений у больных ТБ по сравнению с донорами

ных больных IL-10-продуцирующие клетки также выявлялись преимущественно в популяции CD16<sup>+</sup> моноцитов, однако их количество было значимо выше. Следовательно, можно полагать, что и у здоровых доноров и у больных ТБ IL-10 продуцирующие моноциты сосредоточены преимущественно в популяции CD16<sup>+</sup> моноцитов. Это подтверждается данными корреляционного анализа в общей группе больных и доноров (n=13), который выявил прямую взаимосвязь между количеством CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> и IL-10<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов ( $r=0,63$ ;  $p<0,05$ ). Из полученных данных следует, что повышенное содержание моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10 при туберкулезной инфекции является совокупным результатом как увеличения общего числа CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов, так и доли IL-10-позитивных клеток среди них. Таким образом, у больных ТБ CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты, по-видимому, не связаны с фракцией клеток, обладающих провоспалительной активностью, а, напротив, представляют субпопуля-

цию клеток с противовоспалительной/иммуносупрессорной активностью.

Усиление супрессорной активности моноцитов при туберкулезной инфекции является известным фактом [6, 14, 20] и рассматривается в качестве одной из причин нарушения антигенспецифического ответа. Однако не ясно, характерна ли супрессорная активность для всей популяции моноцитов, или же опосредуется определенной ее субфракцией. Согласно полученным нами ранее данным выраженное угнетение пролиферативного ответа на PPD (PPD-анергия) регистрируется приблизительно у 40% больных ТБ [1-3]. Чтобы выяснить возможную взаимосвязь между дефектом Т-клеточного ответа и популяцией CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов, был проведен сравнительный анализ содержания CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток у пациентов с сохранным и сниженным (<12000 имп/мин) PPD ответом. Как видно из данных таблицы 3, больные со сниженным пролиферативным ответом на PPD характеризовались также более низким уровнем PPD-стимулированной продукции IFN $\gamma$ , что указывало на дефект Th1 клеток. Относительное содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в этой подгруппе было достоверно выше, чем у больных, отвечающих на PPD ( $21,4 \pm 2,4$  и  $15,4 \pm 1,0\%$ , соответственно;  $p<0,05$ ). При этом наиболее яркие различия выявлялись при частотном анализе. Так, частота больных с высоким уровнем CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в подгруппе анергичных пациентов более чем в 2 раза превышала аналогичный показатель PPD-реактивных больных. Таким образом, увеличение относительного содержания CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у больных ТБ ассоциировано с угнетением Th1 антигенспецифического ответа.

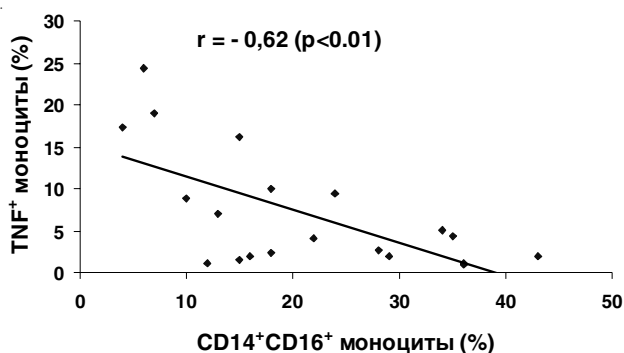


Рис. 1. Корреляционная взаимосвязь между количеством CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов и процентным содержанием моноцитов с внутриклеточным TNF у больных туберкулезом легких

Поскольку прирост CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов может наблюдаться при вирусной и неспецифической бактериальной инфекции [7, 13], которые часто осложняют течение туберкулеза легких, представлялось важным выяснить, с чем связано увеличение CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у обследованных нами больных – непосредственно с туберкулезным процессом или с какой-либо сопутствующей инфекцией. При сравнении больных ТБ без сопутствующей инфекции (n=45), а также пациентов ТБ с хроническим вирусным гепатитом В и/или С (n=16), либо гнойно-септическими осложнениями (n=4) относительное содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов составило соответственно 19,0 ± 1,3; 14,3 ± 1,6 и 15,0 ± 1,5% и значимо не различалось. Следовательно, увеличение относительного количества CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов связано, по-видимому, непосредственно с развитием туберкулезного процесса.

Как было отмечено выше, высокий уровень CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов выявляется у значительной части, но не у всех больных ТБ. Чтобы выяснить, имеется ли взаимосвязь между относительным содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов и клиническими особенностями заболевания, был проведен анализ больных с различными формами и вариантами течения ТБ. Сравнение больных с фиброзно-кавернозной, инфильтративной и диссеминированной формами ТБ не выявило существенных различий в содержании CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в этих подгруппах (17,0 ± 2,1; 20,1 ± 2,4 и 17,6 ± 1,3%, соответственно). Не регистрировалось также достоверных различий в количестве CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у больных ТБ в зависимости от распространенности процесса, локализованного в легких на одной или на обеих сторонах. Содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у больных с резистентностью к туберкулостатической терапии (n=18) было несколько выше, чем в оппозитной подгруппе (20,7 ± 2,6 vs 16,8 ± 1,7%), однако также значимо не различалось. По-видимому, увеличение субпопуляции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов характерно для большинства больных с активной формой туберкулеза легких независимо от клинического варианта течения заболевания.

## Обсуждение

Идентификация новой минорной субпопуляции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов, отличающихся фенотипически и функционально от преобладающей фракции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов периферической крови вызвала большой интерес к исследованию этих клеток при различных патологиях. В результате было показано, что многие воспалительные заболевания аутоиммунного и инфекционного генеза сопровождаются значительным увеличением CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов [13, 22, 24]. Изменение фенотипических и функциональных свойств моноцитов является характерным признаком и для туберкулезной инфекции. Так, полученные нами данные о снижении относительного количества HLA-DR и CD86-позитивных моноцитов согласуются с данными других исследователей о нарушении экспрессии ко-стимуляторных молекул на моноцитах периферической крови больных ТБ [12, 20]. Вместе с тем нами обнаружено увеличение числа моноцитов, экспрессирующих FasL, что явно указывает на состояние активации моноцитов. Причем это факт позволяет с новых позиций рассмотреть механизм ингибирующего действия моноцитов на Т-клетки через Fas/FasL индуцированный апоптоз. Действительно, ранее нами было показано, что угнетение пролиферации Т-клеток при стимуляции PPD ассоциировано с их повышенным апоптозом [2, 3].

Субпопуляция CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> 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 FcγR I и III типа [19]. Поэтому в настоящем исследовании, по сути, впервые продемонстрировано увеличение относительного содержания CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в периферической крови больных ТБ легких. Важно отметить, что у здоровых доноров CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты экспрессируют mРНК TNFα, IL-1 и IL-6, но не IL-10 [4, 24]. Кроме того, содержание CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов при многих заболеваниях ассоциировано с активностью воспалительного процесса [16]. Поэтому общепринятым стало мнение, что данная субпопуляция пред-

Табл.3. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> МОНОЦИТЫ В ПОДГРУППАХ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗМ ЛЕГКИХ С СОХРАННЫМ И СНИЖЕННЫМ PPD-ОТВЕТОМ

Показатель	Больные с сохранным PPD-ответом	Больные с PPD-анергией
Пролиферация (имп/мин):		
Спонтанная	1672 ± 98 (39)	1387 ± 72 (26)
PPD-стимулированная	31973 ± 1775 (39)	4817 ± 421 (26) *
Продукция IFNγ (пкг/мл)	9183 ± 4263 (7)	2787 ± 1592 (5) *
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> моноциты (%)	15,4 ± 1,0 (39)	21,4 ± 2,4 (26) *
Частота больных с высоким (>17%) содержанием CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> моноцитов	25,6% (10/39)	61,5% (16/26) ##

Примечание: \* p<sub>y</sub><0,05 - достоверность различия средних значений и ## p<sub>тмб</sub>=0,004 – достоверность различия частот в подгруппах больных ТБ (p<sub>y</sub> - непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, p<sub>тмб</sub> - точный метод Фишера)

ставлена клетками с выраженной провоспалительной активностью. Полученные нами результаты противоречат такому представлению. Так, нами показано, что моноциты, продуцирующие IL-10, сосредоточены преимущественно во фракции CD16<sup>+</sup> моноцитов, а количество CD16<sup>+</sup> моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10 у больных ТБ повышено в 6 раз. Таким образом, вторым важным заключением, которое следует из полученных данных, является тот факт, что CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты у больных ТБ обладают не провоспалительной, а иммуносупрессорной активностью. Супрессорная активность CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов обсуждается и рядом других авторов. Например, у пациентов с болезнью Кавасаки увеличение числа CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов сопряжено с повышенной концентрацией IL-10 в сыворотке [6]. Снижение продукции IL-1 и увеличение продукции IL-10 на фоне увеличения популяции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов описано у новорожденных и детей младшего возраста с сепсисом. Причем, аналогично полученным нами данным, моноциты периферической крови в этом случае характеризуются снижением экспрессии HLA-DR и CD86 молекул [17]. Субпопуляция моноцитов с супрессорными свойствами выявлена в перитонеальном экссудате больных раком яичника с канцероматозным асцитом. Моноцитарные клетки этих больных продуцируют IL-10 и TGFβ, но не IL-12, IL-1 и TNFα и экспрессируют CD14, CD16 и CD54, но не HLA-DR, CD80, CD86, CD11a, CD11b или CD25 поверхностные антигены [11]. Следовательно, можно полагать, что при разных патологиях CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты могут проявлять различные функциональные свойства.

Супрессорная перестройка моноцитов при ТБ активно обсуждается в контексте угнетения Th1 клеток, контролирующего иммунный ответ на антигены *M.tuberculosis* [6, 14, 20]. Согласно данным литературы IL-10 обладает широким спектром иммуносупрессорной активности, в частности, может оказывать прямой ингибирующий эффект на пролиферацию T-клеток и продукцию Th1 цитокинов, а также экспрессию ко-стимуляторных молекул на антиген-презентирующих клетках и тем самым подавлять иммунный ответ [15]. Анализ пролиферативного ответа на PPD у обследованных нами пациентов позволил разделить их на 2 подгруппы: с сохранной PPD-реактивностью и PPD-анергией. Сравнительный их анализ показал, что пациенты со сниженным PPD-ответом характеризуются угнетением продукции IFNγ и более высоким содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов. Эти данные указывают на то, что важную роль в угнетении Th1 антигенспецифического ответа при ТБ может играть субпопуляция моноцитов, представленная CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетками.

Одним из открытых остается вопрос, с чем связано увеличение числа CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у

больных ТБ. В литературе имеются данные, что индукция CD16 антигена на моноцитах периферической крови происходит под действием ряда цитокинов - трансформирующего рост фактора-β (TGFβ) и IL-10 [10, 22, 24]. Эти же цитокины определяют альтернативный путь активации моноцитов/макрофагов, при котором клетки начинают продуцировать преимущественно цитокины с противовоспалительной/иммуносупрессорной активностью [18]. Поскольку инфицирование моноцитов/макрофагов *M.tuberculosis* сопровождается запуском продукции TGFβ и IL-10 [7, 15], а развитие туберкулезной инфекции сопряжено с Th1→Th2 переключением [15,20], то увеличение популяции CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у больных ТБ, возможно, является результатом активации моноцитов в условиях смещения цитокинового баланса в сторону противовоспалительных/ иммуносупрессорных медиаторов.

## Выводы

1. Больные ТБ характеризуются повышенным содержанием циркулирующих CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов. Увеличение данной субпопуляции моноцитов не связано с сопутствующей вирусной или неспецифической бактериальной инфекцией и выявляется у больных с активной формой туберкулеза независимо от формы и распространенности туберкулезного процесса.

2. Увеличение CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов у больных ТБ сопряжено со снижением количества моноцитов, продуцирующих TNFα, и увеличением количества IL-10 продуцирующих клеток. При этом моноциты с внутриклеточной экспрессией IL-10 сосредоточены исключительно среди CD16<sup>+</sup> моноцитов, что свидетельствует о супрессорной активности CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток.

3. Частота встречаемости пациентов с повышенным содержанием CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов и средний уровень этих клеток выше у больных с угнетением PPD-стимулированной пролиферации и продукции IFNγ, что указывает на возможную роль CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток в нарушении Th1 антигенспецифического ответа при туберкулезе легких.

Авторы выражают признательность Региональному общественному фонду содействия отечественной медицине за поддержку в проведении исследований.

## Список литературы

1. Сахно Л.В., Хонина Н.А., Норкина О.В., Мосютова Г.В., Никонов С.Д., Огиренко А.П., Черных Е.Р., Останин А.А. Участие оксида азота в развитии туберкулиновой анергии у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 8. – С.42-46.

2. Хонина Н.А., Сахно Л.В., Норкин М.Н., Норкина О.В., Мостовая Г.В., Никонов С.Д., Огиренко А.П., Останин А.А., Черных Е.Р. Апоптоз лимфоцитов как возможный механизм нарушений антигенспецифического ответа при туберкулезе легких // *Мед. Иммунология*. – 2001. – Т. 3, № 1. – С.51-59.
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 // *Проблемы туберкулеза*. – 2002. – №7. – С. 43-48.
4. Belge K.U., Dayyani F., Horelz A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF // *J. Immunol.* – 2002. – Vol.168. – P. 3536-3542.
5. Dayyani F., Belge K.U., Frankenberger M., Mack M., Berki T., Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 74. – P. 33-39.
6. 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.
7. Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Strobel M., Ziegler-Heitbrock H.W. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes is expanded in sepsis patients // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – P. 3170-3176.
8. Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., Flad H.D., Ernst M. Phenotypical and functional characterization of F $\gamma$  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.
9. Katayama K., Matsubara T., Fujiwara M., Koga M., Furukawa S. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes subpopulation in Kawasaki disease // *Clin. Exp. Immunol.* – 2000. – Vol. 121. – P. 566-570.
10. Li G., Kim Y.J., Mantel C., Broxmeyer H.E. P-selectin enhances generation of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 669-677.
11. Loercher A.E., Nash M.A., Kavanagh J.J., Platoucas C.D., Freedman R.S. Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells // *J. Immunol.* – 1999. – Vol.163. – P.62-71.
12. Mariotti S., Teloni R., Iona E., Fattorini L., Giannoni F., Romagnoli G., Orefici G., Nisini R. *Mycobacterium tuberculosis* subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 32. – P. 3050-3058.
13. Nockher W.A., Scherberich J.E. Expanded CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 2782-2790.
14. 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.
15. Rojas R.E., Balaji K.N., Subramanian A., Boom W.H. Regulation of human CD4(+) alpha-beta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gamma-delta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 6461-6472.
16. Scherberich J.E., Nockher W.A. CD14<sup>++</sup> monocytes, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory system diseases and monitoring immunosuppressive therapy // *Scand. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 55. – P. 629-638.
17. Skrzeczynska J., Kobylarz K., Hartwich Z., Zembala M., Pryjma J. CD14<sup>+</sup>16<sup>+</sup> monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies // *Scand. J. Immunol.* – 2002. – Vol. 55. – P. 629-638.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Wijngaarden S., van Roon J.A.G., Bijlsma J.W.J., van de Winkel J.G.J., Lafeber F.P.J. Fc $\gamma$  receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patient with high erythrocyte sedimentation rate // *Immunol.* – 1997. – Vol. 77. – P. 298-303.

tation rate who do not use anti-rheumatic drugs // Rheumatol. – 2003. – Vol. 42. – P. 681-688.

23. Ziegler-Heitbrock H.W., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelzer F., Schutt C., Passlick B., Pforte A. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes

exhibits features of tissue macrophages // Eur. J. Immunol. - 1993. - Vol. 23. - P.2053-2058.

24. Ziegler-Heitbrock H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> subpopulation / Immunol. Today. – 1996. – Vol. 17. – P. 424-428.

*поступила в редакцию 14.10.2004*

*принята к печати 21.12.2004*