

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

ВИНС МАРИЯ ВАСИЛЬЕВНА

**НАРУШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА МОНОЦИТОВ КРОВИ  
ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГИПОКСИЕЙ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д-р мед. наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
О.И. Уразова

д-р мед. наук  
С.П. Чумакова

Томск – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	13
1.1 Краткая характеристика моноцитов и макрофагов	13
1.1.1 Гетерогенность популяции моноцитов	14
1.1.2 Гетерогенность популяции макрофагов	18
1.1.2.1 Классически активированные макрофаги (M1-макрофаги)	20
1.1.2.2 Альтернативно активированные макрофаги (M2-макрофаги)	21
1.3 Адаптация к гипоксии и дифференциация моноцитов	22
1.3.1 NF- $\kappa$ B-1 фактор и воспаление	24
1.3.2 Дифференциация моноцитов и макрофагов в условиях гипоксии	26
1.4 Моноциты/макрофаги в патогенезе ишемической болезни сердца	27
1.5 Моноциты/макрофаги в патогенезе туберкулеза и хронической обструктивной болезни легких	29
1.6 Галектин-2 и его роль в поляризации макрофагов	33
1.7 Галектин-9 и его участие в дифференциации клеток	35
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	37
2.1 Объект и материал исследования	37
2.2 Иммунофенотипирование моноцитов	40
2.3 Определение клеточности в образцах клеточных суспензий крови и костного мозга	42
2.4 Измерение концентрации иммунорегуляторных медиаторов в плазме крови и надосадке костного мозга	43
2.5 Статистический анализ результатов исследования	45
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	46
3.1 Субпопуляционный состав моноцитов крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких	46
3.2 Субпопуляционный состав моноцитов костного мозга у больных с	

ишемической болезнью сердца	48
3.3 Медиаторный спектр плазмы крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких	49
3.4 Сравнение концентрации цитокинов, ИФ-1 альфа и галектинов в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца	51
3.5 Корреляции между численностью субпопуляций моноцитов и концентрацией иммунорегуляторных медиаторов в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца	53
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	55
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	72
<b>ВЫВОДЫ</b>	74
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	76
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	78

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В последние годы стало известно о функциональной неоднородности моноцитов крови, обладающих различным эффекторным потенциалом, среди которых различают классические  $CD14^{++}CD16^{-}$  клетки, предназначенные для фагоцитоза, промежуточные  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноциты, осуществляющие иммунную функцию взаимодействия с Т-лимфоцитами, неклассические  $CD14^{+}CD16^{++}$  клетки, обладающие высоким аффинитетом к эндотелию и названные «патрулирующими», и переходные  $CD14^{+}CD16^{-}$  [197]. Первая популяция моноцитов секретирует преимущественно интерлейкин (IL)-10, две последние – IL-1бета и фактор некроза опухоли (TNF) альфа [53, 131, 182]. О переходных  $CD14^{+}CD16^{-}$  моноцитах известно немного. Возможно, они дифференцируются из классических  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноцитов, но характеризуются низкой экспрессией CD14 [197].

В тканях моноциты трансформируются в макрофаги, которые также характеризуются гетерогенностью. Классически активированные макрофаги (M1) образуются в присутствии интерферона (IFN) гамма и обладают провоспалительным потенциалом: выраженной способностью к фагоцитозу и киллингу, синтезу провоспалительных цитокинов. Для созревания альтернативно активированных макрофагов (M2) необходимы IL-4 и IL-13. M2 проявляют регуляторные и противовоспалительные свойства: продуцируют в основном IL-10, трансформирующий фактор роста (TGF) бета и в небольшом количестве IL-12, провоспалительные цитокины и прооксиданты, а также активируют синтез коллагена и процессы ремоделирования, обладают низкой способностью к фагоцитозу (поглощают и разрушают апоптотные тела) [131]. Некоторые галектины способны влиять на поляризацию дифференциации макрофагов: галектин-2 способствует генерации M1-макрофагов, угнетая созревание M2-клеток и ангиогенез, а галектин-9 индуцирует образование M2-макрофагов и Т-лимфоцитов-хелперов типа 2 (Th2) [80, 82]. При этом вторая популяция макрофагов составляет всего 15-20% и подразделяется еще на 3 разновидности –

M2a, M2b и M2c [16].

Дисбаланс субпопуляций моноцитов и макрофагов обнаруживается при различных заболеваниях, ассоциированных с воспалением как инфекционного, так и неинфекционного генеза. Особенно актуальным это становится в сочетании с гипоксией. В частности, при гипоксическом повреждении тканей на фоне ишемии отмечается системная воспалительная реакция и активация системы моноцитов/макрофагов [150]. Гипоксия непосредственно стимулирует наработку индуцируемого гипоксией фактора (HIF-1) в различных клетках организма и активирует моноциты/макрофаги, способные продуцировать ряд провоспалительных цитокинов (TNF-альфа, интерлейкины IL-1бета, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, хемокины IL-8, хемоаттрактантный белок моноцитов-1 (MCP)-1, воспалительный белок макрофагов-1альфа (MIP)-1альфа), ферменты (кислую фосфатазу, миелопероксидазу, матриксные металлопротеиназы MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13) и прооксиданты, что усугубляет тканевое повреждение [16, 100, 180]. Однако макрофаги, активированные HIF-1 и провоспалительными цитокинами, могут вызывать не только повреждение и фиброз ткани, но также неоангиогенез ввиду их способности синтезировать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – vascular endothelial growth factor) и ангиопоэтин Ang2, что при гипоксии является компенсаторно-приспособительной реакцией. На связь моноцитопоза с ангиогенезом указывает свойство CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов экспрессировать рецепторы к VEGF (CD14<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> клетки) [183].

Известно, что генерация моноцитов в красном костном мозге происходит под контролем многих гемопоэтинов, одни из которых стимулируют митотическую активность предшественников моноцитов (IL-3, IL-4, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF)), другие – угнетают ее (простагландин E, IFN-альфа и IFN-бета). Кроме того, позитивную регуляцию гемопоэза на ранних его стадиях осуществляют IL-1бета, IL-6, IL-11, IL-12, в то время как TGF-бета, MIP и TNF тормозят выход стволовых кроветворных клеток из фазы G<sub>0</sub> в клеточный цикл [167].

Однако на сегодняшний день нет убедительных данных о механизмах регуляции моноцитопоеза, определяющих генерацию какой-либо субпопуляции моноцитов. Неизвестно, субпопуляционный состав моноцитов крови определяется только цитокиновым спектром крови или также на уровне костного мозга. Кроме того, чрезвычайно важными для фундаментальной науки являются знания о роли гипоксии в процессах регуляции дифференциации моноцитов на фоне заболеваний инфекционной и неинфекционной природы и выявление универсальных и специфических механизмов регуляции субпопуляционного состава моноцитов крови при гипоксии различного генеза.

**Степень разработанности темы исследования.** Важная роль моноцитов/макрофагов в развитии и прогрессировании гипоксического повреждения сердца подтверждается аккумуляцией моноцитов в ишемизированном миокарде человека после острой коронарной недостаточности в сочетании с резким уменьшением их количества в костном мозге и селезенке [139]. Согласно данным литературы, у больных с хронической сердечной недостаточностью и циркуляторной гипоксией на фоне ишемической болезни сердца (ИБС) отмечается увеличение количества CD16-позитивных моноцитов в крови [53, 132, 183]. При этом доля этих клеток у пациентов с гиперхолестеремией возрастает, положительно коррелируя с концентрацией общего холестерина и триацилглицеролов в крови, и является обратно пропорциональной концентрации липопротеинов высокой плотности [60]. Показано, что количество промежуточных моноцитов в крови тесно связано с тяжестью стенокардии при ИБС [61, 180].

При заболеваниях, сопровождающихся развитием дыхательной гипоксии, также отмечаются изменения субпопуляционного состава моноцитов крови. Примером рестриктивной формы дыхательной недостаточности инфекционной этиологии является туберкулез легких, при котором количество CD16-позитивных моноцитов может составлять до 40% от их общего числа в крови [114]. Показано, что уменьшение доли данной субпопуляции моноцитов в крови у больных туберкулезом способствует дифференциации дендритных клеток, а их наличие,

наоборот, нарушает данный процесс даже у здоровых лиц [114]. Предполагается, что важную роль в генерации CD16-позитивных моноцитов играет TGF-бета, содержание которого у больных туберкулезом значительно превышает норму [114, 189]. По сведениям ряда исследователей, при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), характеризующейся развитием дыхательной недостаточности неинфекционного генеза, содержание промежуточных клеток в крови возрастает в момент рецидива. По другим данным, активность хемотаксиса и количество промежуточных клеток не изменяются [63].

Принимая во внимание информацию последних лет о структурно-функциональной гетерогенности моноцитов/макрофагов и способности гипоксии влиять на систему мононуклеарных фагоцитов, а также высокую социальную значимость заболеваний, ассоциированных с циркуляторной и дыхательной гипоксией, таких как ИБС, туберкулез легких и ХОБЛ, становится важным анализ механизмов регуляции дифференциации моноцитов при этих болезнях, а также определение дистантных и локальных факторов регуляции моноцитопоза при гипоксии.

**Цель исследования:** установить общие закономерности, особенности и медиаторы нарушений субпопуляционного состава моноцитов крови при заболеваниях, ассоциированных с циркуляторной (ишемическая болезнь сердца) и дыхательной (хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез легких) гипоксией.

**Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать нарушения соотношения классических  $CD14^{++}CD16^{-}$ , промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$ , неклассических  $CD14^{+}CD16^{++}$  и переходных  $CD14^{+}CD16^{-}$  моноцитов в крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких.

2. Оценить содержание HIF-1альфа, цитокинов (IL-1бета, IL-6, TNF-альфа, M-CSF, IFN-гамма, IL-4, IL-10, IL-13), галектинов 2, 9 в плазме крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких и его связь с изменениями субпопуляционного

состава моноцитов крови в зависимости от вида гипоксии.

3. Сравнить субпопуляционный состав моноцитов крови и костного мозга и оценить содержание NIF-1альфа, цитокинов (IL-1бета, IL-6, TNF-альфа, M-CSF, IFN-гамма, IL-4, IL-10, IL-13), галектинов 2, 9 в костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца.

4. На основе сравнительного анализа спектра плазменных и интрамедуллярных медиаторов определить факторы регуляции субпопуляционного состава моноцитов крови и костного мозга у больных с ишемической болезнью сердца.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование общих закономерностей и особенностей нарушений состава субпопуляций моноцитов при заболеваниях, ассоциированных с циркуляторной гипоксией (ИБС) и дыхательной гипоксией с учетом природы болезнетворного фактора – инфекционная (туберкулез легких, ТЛ) и неинфекционная (ХОБЛ). Получены актуальные данные о том, что перераспределение субпопуляционного состава моноцитов в крови при заболеваниях сердца и легких не зависит от вида гипоксии (циркуляторная или дыхательная), а определяется природой активирующего стимула в связи с особенностями их этиологии и патогенеза. Впервые охарактеризованы субпопуляции моноцитов костного мозга у больных ИБС, определены локальные (костномозговые) и дистантные (гемические) гуморальные факторы, модулирующие субпопуляционный состав моноцитов крови и костного мозга при ИБС.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Установленные различия субпопуляционного состава моноцитов крови и костного мозга указывают на экстрамедуллярное перераспределение клеток по CD-фенотипу. При этом их соотношение в костном мозге и крови зависит от плазменной концентрации иммунорегуляторных молекул, что указывает на возможность активного управления созреванием моноцитов посредством коррекции цитокинового спектра плазмы крови или стимуляции клеток *in vitro*. Обоснована последовательная дифференциация классических моноцитов в промежуточные



клетки. Показано, что переходные клетки являются не производными классических моноцитов, а их предшественниками, поскольку преобладают в костном мозге.

Обнаружено, что активация моноцитарно-макрофагальной системы, как компонента врожденного иммунитета, при ХОБЛ сопровождается избыточной генерацией классических моноцитов, а при ТЛ и ИБС – накоплением в крови промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноцитов вне зависимости от этиологии заболевания (инфекционная при ТЛ и неинфекционная при ИБС). В целом, изучение дисбаланса субпопуляций моноцитов крови может быть использовано для оценки динамики течения и прогрессирования болезней, ассоциированных с гипоксией вне зависимости от ее вида. Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейших исследований по изучению влияния различных гуморальных факторов на дифференциацию субпопуляций моноцитов крови *in vitro* и *in vivo*.

**Методология и методы исследования.** Для реализации поставленных задач обследованы пациенты с ИБС, страдающие недостаточностью кровообращения II-III функционального класса по NYHA; больные с ХОБЛ в стадии ремиссии, и больные с впервые выявленным инфильтративным ТЛ до проведения противотуберкулезной терапии. Материалом для исследования служила венозная кровь и (только у больных ИБС) красный костный мозг. Относительное количество субпопуляций моноцитов ( $CD14^{+}$ ,  $CD16^{+}$ ) в цельной крови и костном мозге определяли методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), HIF-1 $\alpha$  и галектинов (2 и 9) в плазме крови и (только у больных ИБС) надосадке костного мозга измеряли методом иммуноферментного анализа. Исследования проводились в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии на базе кафедры патофизиологии (заведующий – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории (руководитель – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удут) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В крови у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и туберкулезом легких преобладают классические CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> моноциты на фоне дефицита переходных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клеток. В костном мозге у больных ИБС превалируют переходные формы клеток.

2. Изменения субпопуляционного состава моноцитов и медиаторного спектра крови при ИБС и обструктивно-рестриктивных заболеваниях легких не связаны с видом сопровождающей их течение гипоксии (циркуляторная или дыхательная).

3. Нарушения субпопуляционного состава моноцитов крови при ХОБЛ ассоциированы с повышением концентрации IL-6, IL-13 и галектина-9, а при туберкулезе легких – с избытком IL-13 и дефицитом IFN-гамма, галектина-2 в плазме крови.

4. При ИБС субпопуляционный состав моноцитов костного мозга зависит от интрамедуллярной концентрации IL-10, IL-13 и M-CSF. В крови он перераспределяется в условиях дефицита M-CSF при соответствующей норме концентрации IL-10 и NIF-1альфа.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, что подтверждается достаточным объемом клинико-лабораторного материала, использованием современных методов исследований (проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ) и оборудования, адекватных цели и задачам критериев для статистического анализа данных.

Основные положения научной работы докладывались и обсуждались на VI Евразийском съезде кардиологов (Москва, 18-19 апреля 2018 г.); VII Евразийском съезде кардиологов (Ташкент, 16-17 мая 2019 г.); II Международной конференции «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.); VII Конгрессе «Национальной ассоциации фтизиатров» (Санкт-Петербург, 15-17 ноября 2018 г.);

Научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии», посвящённой 130-летию кафедры физиологии СибГМУ и НИ ТГУ (Томск, 23-24 мая 2019 г.); Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 24-29 июня 2019 г.); Российском национальном конгрессе кардиологов (Екатеринбург, 24-26 сентября 2019 г.); II Научно-практической конференции «Фундаментальные проблемы управления системой крови» (Москва, 25 октября 2019), Всероссийской научной конференции «Патофизиология и фармакология системы крови», посвященной 35-летию НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (Томск, 10-11 октября 2019 г.).

Работа осуществлена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7) и Российского фонда фундаментальных исследований (№18-015-00160\19).

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 98 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка сокращений и литературы. Работа иллюстрирована 4 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель включает 197 источников, из них 46 отечественных и 151 зарубежных авторов.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 18 работ, из них 7 статей в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 зарубежная статья и 10 публикаций (тезисы) в сборниках научных конференций и конгрессов.

**Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации.** Соискатель принимал непосредственное участие в разработке концепции, дизайна и планировании исследования, его цели и задач. Им лично проведены клиничко-лабораторные исследования, статистически обработаны, проанализированы, оформлены и обсуждены результаты, лично или в соавторстве подготовлены публикации по теме диссертации. Оформление диссертации, ее

иллюстративного материала и автореферата выполнены соискателем самостоятельно.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Краткая характеристика моноцитов и макрофагов

Еще в 70-х гг. XX века сформировались знания о системе мононуклеарных фагоцитов, которая объединяет в себе группу клеток с общим происхождением, строением и функцией (активный фагоцитоз и пиноцитоз) [5].

Моноциты в костном мозге последовательно дифференцируются из коммитированных полиолигопотентных (бипотентных) клеток-предшественниц гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ) и моноолигопотентных клеток-предшественниц макрофагов (КОЕ-М). Они циркулируют в кровотоке, а затем переходят из кровеносного русла в ткани, где созревают в различные типы макрофагов [6, 89].

Моноциты способны к амёбовидному движению и фагоцитозу. Они фагоцитируют остатки собственных погибших клеток, различные микроорганизмы и грибы, а также пораженные вирусами и стареющие собственные клетки. Однако в крови *in vivo* они практически не осуществляют фагоцитарные функции. Кроме фагоцитоза, моноциты выполняют секреторную и синтетическую функцию. Они синтезируют и выделяют ряд медиаторов воспаления: интерлейкины (IL-1, IL-6 и др.), интерферон (IFN) гамма, факторы некроза опухоли (TNF-альфа), ангиогенеза и роста фибробластов, ряд прокоагулянтов, белки системы комплемента [13].

Макрофаги характеризуются структурной и функциональной гетерогенностью в зависимости от степени их зрелости, локализации, а также от их активации антигенами или лимфоцитами. Макрофаги делятся на свободные (мобильные) и фиксированные (резидентные) [21].

Особенностью структуры макрофагов является большое количество лизосом в их цитоплазме. Тканевые макрофаги являются активными фагоцитами, которые могут поглощать и разрушать остатки разрушившихся тканей, эритроциты, опухолевые клетки, грибы, простейших, бактерии (микобактерии,

листерии, бруцеллы и др.). Основной их функцией является участие в реакциях врожденного и (на стадии распознавания, презентации и деструкции антигена) адаптивного иммунитета, а также секреции различных биологически активных веществ. В тканях макрофаги активируют либо супрессируют функции лимфоцитов посредством рецепторов и медиаторных молекул [31].

За последнее время, значительное внимание к разнообразию моноцитов и поляризации макрофагов дало важную информацию о роли миеломоноцитарных клеток в патогенезе различных заболеваний человека.

### 1.1.1 Гетерогенность популяции моноцитов

Ранее считалось, что моноциты представляют собой одну популяцию циркулирующих гемопоэтических клеток. Позднее проведенные исследования подтвердили гипотезу о гетерогенности моноцитов, выдвинутую в начале 1980-х годов [79]. Первоначально моноциты идентифицировались на основе морфологических и цитохимических особенностей (положительная реакция на неспецифическую эстеразу), а затем методом проточной цитофлуориметрии, которая основывается на свойствах рассеивания света и на определении маркеров клеточной поверхности – CD14, CD16 и др. [159]. Классические моноциты не несут CD16-антиген ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), тогда как неклассические моноциты имеют меньший размер и экспрессируют CD16 на поверхности ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) [176].

Последующие два десятилетия дали значительное представление о роли каждой клеточной субпопуляции моноцитов в развитии, течении и исходах заболеваний. В 2010 году была принята номенклатура, согласно которой рекомендуется выделять три субпопуляции моноцитов крови человека в зависимости от экспрессии на поверхности низкоаффинного рецептора Fc-гамма (CD16) и корецептора липополисахарида (CD14):  $CD14^{++}CD16^{-}$  «классическая»,  $CD14^{++}CD16^{+}$  «промежуточная» и  $CD14^{+}CD16^{++}$  «неклассическая» [17, 18, 19]. На сегодняшний день в литературе выделили субпопуляцию переходных  $CD14^{+}CD16^{-}$  моноцитов, но их свойства и функции изучены мало [64]. Имеется

небольшое количество исследований, посвященных изучению функциональных и фенотипических особенностей субпопуляций моноцитов, и полученные результаты свидетельствуют об их уникальных свойствах [19]. CD14 является рецептором распознавания образов, а классические моноциты являются критическими компонентами врожденного иммунитета, тогда как CD16<sup>+</sup> (промежуточные и неклассические) моноциты преимущественно мобилизуются во время воспаления и придают им обозначение как «провоспалительные» [22, 58, 101].

Классические CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> моноциты представляют наибольшую субпопуляцию моноцитов крови (примерно 83-85% от всех моноцитов) и являются важными «клетками-мусорщиками», которые характеризуются выраженной фагоцитарной и бактерицидной активностью, продукцией активных форм кислорода, оксида азота, миелопероксидазы, лизоцима, а также хемокинов IL-8, CCL2, CCL3 и экспрессируют его родственный рецептор CCR2, который имеет решающее значение для эмиграции моноцитов из костного мозга и «возвращающихся домой» моноцитов [173]. Присутствие на поверхности CD62L является важным ранним маркером принадлежности клеток-предшественниц к определенному семейству и обеспечивает хоуминг в лимфатические узлы [17, 18, 39, 64, 141]. Классические моноциты экспрессируют в большом количестве Fc-гаммаRI (CD64), рецепторы для хемотаксических факторов и бета2-интегрины, особенно Mac-1 (CD11b/CD18). Таким образом, эти клетки имеют необходимые маркеры для эмиграции в очаги воспаления, осуществления фагоцитарной и цитолитической активности и поэтому рассматриваются как предшественники провоспалительных (M1) макрофагов.

Неклассические CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноциты часто упоминаются как провоспалительные, поскольку они обладают высокой способностью продуцировать провоспалительные цитокины, такие как TNF-альфа, и их количество увеличивается при различных воспалительных заболеваниях, таких как атеросклероз [59, 173]. Они составляют в циркулирующей крови всего лишь до 7-11% от общего количества моноцитов, тогда как основная их часть находится

в маргинальном пуле крови вдоль эндотелия сосудов [19, 141]. Субпопуляцию  $CD14^+CD16^{++}$  называют «патрулирующей», поскольку клетки способны прикрепляться к эндотелиальной выстилке сосудов и, двигаясь вдоль капилляров, мелких вен и артерий, осуществлять контроль за состоянием эндотелия и осуществлять местную защиту его от вирусных и других антигенов, окисленных липопротеинов и поврежденных клеток [24]. Повышенная тропность к эндотелию и высокая миграционная активность, даже через неактивированный слой эндотелиальных клеток, связаны с особенностями поверхностной экспрессии адгезивных и хемокиновых рецепторов. Они экспрессируют большое количество молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex (MHC))-II и костимулирующих молекул, обладают относительно слабой фагоцитарной активностью, но эффективно презентируют антигены Т-лимфоцитам, и секретируют IFN-альфа [19]. Увеличение их количества имеет место при патологических процессах, таких как сепсис, острые и хронические заболевания вирусной и бактериальной этиологии и др. Они рассматриваются в качестве предшественников резидентных (M2) макрофагов [19].

Промежуточные  $CD14^{++}CD16^+$  моноциты остаются недостаточно изученными, поскольку в большинстве клинических и экспериментальных исследований, проведенных до принятия номенклатуры, эти клетки либо игнорировались, либо анализировались совместно с неклассическими  $CD14^+CD16^{++}$  моноцитами [24, 173]. Процентное содержание в крови  $CD14^{++}CD16^+$  4-5% [39]. Особенностью данной субпопуляции является высокая экспрессия HLA-DR, CX3CR1 и рецепторов CD11c, умеренная CD64, CCR2 и CD62L, что формирует промежуточный фенотип этих клеток и определяет их функциональные характеристики. Эта субпопуляция моноцитов, как и дендритные клетки, обладает иммунорегуляторной функцией – оказывает выраженное стимулирующее действие на Th-клетки [174]. Они, совместно с неклассическими моноцитами, являются главными продуцентами провоспалительных цитокинов – TNF-альфа, IL-1бета и IL-12 [173, 174]. При этом они проявляют умеренную фагоцитарную активность, ограниченную способность



к респираторному «взрыву» и синтезу хемокинов IL-8, MCP-1, CCL3 [22].

Экспрессия антигена и продуцирование цитокинов каждой субпопуляцией моноцитов является основой классификации клеток. Функционально классические  $CD14^{++}CD16^{-}$  и промежуточные  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноциты обладают большей фагоцитарной активностью, чем неклассические моноциты [138]. Кроме того, уникальные функции в ангиогенезе, продуцировании активных форм кислорода и поведение патрулирования были отнесены к моноцитам  $CD16^{+}$  [138].

Другие данные, напротив, предоставили генетические и функциональные доказательства того, что  $CD16^{+}$  моноциты объединяются и отличаются от классических  $CD16^{-}$  моноцитов [129, 130]. Так, в исследовании K.L. Wong et al. (2011) были доказаны отличия между субпопуляциями промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$  и классических  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноцитов через генетические профили у людей и макак-резусов [86]. Одним из примеров различий между промежуточными  $CD14^{++}CD16^{+}$  и классическими  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноцитами является экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которая была максимальной у промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноцитов. Высокая экспрессия МНС II указывает на то, что промежуточные моноциты вовлечены в иммунный ответ на экзогенные антигены и могут оказывать стимулирующий эффект на  $CD4^{+}$  Т-лимфоциты. Еще одной отличительной чертой  $CD14^{++}CD16^{+}$  клеток был высокий уровень продукции TNF-альфа и IL-1бета в ответ на стимуляцию липополисахаридом (LPS). Классические  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноциты экспрессировали широкий спектр генов, участвующих в восстановлении тканей и иммунном ответе, и секретировали большое количество цитокинов и хемокинов в ответ на стимуляцию LPS [86].

Принято считать, что классические моноциты возникают из костного мозга и приводят к образованию промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$  и неклассических  $CD14^{+}CD16^{++}$  моноцитов. Это обеспечило теоретическую основу для понимания процессов созревания моноцитов [139, 174]. J. Cros et al. (2010) показали, что неклассические  $CD14^{+}CD16^{++}$  моноциты дифференцируются независимо от классических  $CD14^{++}CD16^{-}$  и промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноцитов [102].

Новые данные о функциональном разнообразии субпопуляций моноцитов позволили выявить воспалительные характеристики  $CD14^+CD16^{++}$  неклассических моноцитов и уделить более значительную роль  $CD14^{++}CD16^+$  промежуточным моноцитам в процессе воспаления.

### 1.1.2 Гетерогенность популяции макрофагов

Подобно моноцитам, макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию. В физиологических условиях большинство макрофагов, за исключением тех, что находятся в кишечнике, происходят не из моноцитов, а из местных предшественников, которые возникают из эмбрионального желточного мешка [66, 74, 188]. Макрофаги, образующиеся из местных клеток-предшественниц, занимают свое «место жительства» в соответствующих тканях еще до рождения, как доказано экспериментально, образуя клетки микроглии в головном мозге, макрофаги легких, клетки Лангерганса в коже и клетки Купфера в печени [148].

Несмотря на то, что большинство макрофагов происходит от местных предшественников, воспаление изменяет их источник. При воспалении большинство макрофагов происходит из так называемых «воспалительных» моноцитов ( $CD14^{++}CD16^-$ ), которые привлекаются к месту альтерации из пула клеток крови. Макрофаги представляют собой сложную клеточную популяцию с высоким уровнем пластичности [195]. После активации макрофаги могут выполнять множество различных, иногда разнонаправленных функций, таких как стимулирование воспалительных реакций и ангиогенеза, ингибирование роста опухоли, ремоделирование тканей и разрушение клеток [21, 124, 160].

Ранние исследования показали, что функция макрофагов определяется с их микроокружением, особенно комбинацией и концентрацией цитокинов. С начала 1980 годов С.Ф. Nathan et al. (1983) определили, что IFN-гамма, стимулирующий продукцию пероксидов фагоцитами, повышает способность макрофагов убивать внутриклеточные патогенные микроорганизмы [112]. Позднее был

идентифицирован IL-4, противовоспалительный цитокин, который индуцирует другой (по сравнению с IFN-гамма) спектр экспрессии генов макрофагов. Это было показано в 2000-х годах, когда С.Д. Mills с коллегами (2012) предложили обозначение M1- и M2-макрофагов на основании данных, полученных в эксперименте с использованием мышиных линий [137]. Они идентифицировали два типа лимфоцитов и обнаружили, что один тип T-лимфоцитов продуцировал, главным образом, IFN-гамма, активирующий синтез оксида азота (NO) макрофагами из аргинина, другой – секретировал IL-4 и TGF-бета1, и активированные ими макрофаги генерировали орнитин из аргинина. Это дало основание разделить макрофаги на две популяции, по-разному влияющие на развитие воспаления [137].

После классификации системы Th1/Th2-лимфоцитов обозначения M1 (провоспалительный фенотип) и M2 (иммуномодуляторный и тканевой ремоделирующий фенотип) были введены в номенклатуру макрофагов, чтобы определить два основных поляризованных активационных состояния клеток. Такое обозначение соответствует классификации активированных T-лимфоцитов на типы Th1 и Th2, и подчеркивает связь макрофагов определенного фенотипа с реализацией соответствующего типа иммунного ответа [88]. Как правило, поляризация M1-макрофагов индуцируется липополисахаридами или IFN-гамма (также известная как классическая активация), что приводит к провоспалительному ответу и увеличению микробицидной способности клеток. В микросредах, в которых доминируют IL-4 или IL-13, макрофаги подвергаются поляризации в M2-клетки (также известной как альтернативная активация), которая опосредует восстановление тканей и слабую иммунную защиту от патогенов и опухолей, что приводит к хронизации инфекций и развитию опухолей [56, 131]. В дополнение к их различным функциям, макрофаги M1 и M2 демонстрируют различные секреторные профили. У человека макрофаги M1 характеризуются высоким уровнем секреции CXCL10, CXCL11, CCR7, TNF-альфа, IL-6 и IL-12, тогда как макрофаги M2 проявляют повышенный уровень секреции CCL17, CCL18 и IL-10 [190]. Недавние исследования показали, что

статус активации и поляризации макрофагов имеет решающее значение для развития иммунных реакций хозяина против инвазивных патогенов [166].

Действительно, макрофагальные клетки обладают как провоспалительной, так и противовоспалительной активностью, могут оказывать деструктивное действие на ткани и участвовать в процессах репарации. Подобное разнообразие противоположных эффектов объясняется высокой функциональной гетерогенностью популяции макрофагов в организме [32].

Это доказывает актуальность изучения парадигмы популяций M1/M2, которые играют разную роль во время иммунных реакций при различных болезнях и патологических состояниях.

### **1.1.2.1 Классически активированные макрофаги (M1-макрофаги)**

Макрофаги M1 характеризуются способностью продуцировать провоспалительные цитокины, обеспечивать устойчивость к патогенам в связи с сильными бактерицидными свойствами, однако эти процессы сопровождаются тканевой деструкцией. Классическая активация макрофагов происходит, когда клетка получает такие стимулы, как IFN-гамма, главным образом секретируемый Th1-клетками, цитотоксическими T-лимфоцитами и натуральными киллерами (NK-клетками); LPS, компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий; колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), который стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [47, 90].

Макрофаги M1 обладают способностью секретировать цитокины, такие как IL-1, TNF-альфа, IL-12 и IL-18; фенотипически они обладают высокой степенью экспрессии антигенов MHC-II, маркера CD68 и молекул костимуляции CD80 и CD86. Эти макрофаги также обладают выраженной способностью к фагоцитозу и киллингу патогенных микроорганизмов (бактерий) [117].

Сигнальный путь, по которому регулируется поляризация макрофагов, до конца не изучен, но известно несколько молекул, вовлеченных в этот процесс, включающих регуляторные факторы семейства интерферонов, сигнальные

трансдукторы и активаторы транскрипции (STAT), и SOCSs. В 1990 годы было показано, что фактор транскрипции STAT1 имеет решающее значение для поляризации M1-макрофагов [196].

В эксперименте на мышах было выявлено, что на поздних стадиях туберкулезной инфекции количество альтернативно-активированных макрофагов увеличивается, что приводит к нарушению продукции активных метаболитов кислорода и способствует «выживанию» микобактерий [49]. Известно, что макрофаги играют двоякую роль при туберкулезе: с одной стороны, ввиду нарушения их микробицидных свойств (блокады фагосома-лизосомального слияния), они становятся «резервуаром» туберкулезной инфекции, с другой стороны, уменьшение числа активированных макрофагов опосредует усиление роста микобактерий и снижение количества гранулем, что связано с дефицитом продукции провоспалительных медиаторов, включая цитокины IL-1бета, TNF-альфа и др. [69].

### **1.1.2.2 Альтернативно активированные макрофаги (M2-макрофаги)**

Макрофаги, активированные по пути, противоположному классическому, называются M2, или альтернативно активированными макрофагами. Было показано, что такие стимулы, как M-CSF и GM-CSF, IL-4, IL-10, TGF-бета, и IL-13, грибковая и гельминтозная инфекции стимулируют поляризацию созревания макрофагов в M2-субпопуляцию. M2-макрофаги продуцируют в высокой концентрации IL-10 и в небольшом количестве IL-12. Они играют центральную роль в ответной реакции на паразитарную инфекцию, в процессах ремоделирования тканей при аллергических заболеваниях, в ангиогенезе [135].

Фенотипически эта субпопуляция характеризуется экспрессией макрофагального маннозного рецептора (MMR), классифицированного как CD206. Молекулярная сеть, участвующая в M1- и M2-поляризации дифференциации макрофагов, включает в себя цитокины определенных семейств. Было отмечено, что дефицитные по IL-4Ральфа мыши чрезвычайно

восприимчивы к гельминтной инвазии, в патогенезе которой значение имеет Th2-иммунный ответ, для оптимального течения которого необходимы макрофаги M2 [156]. Было высказано предположение, что M2-макрофаги являются популяцией эффекторных клеток, способствующих выведению из организма взрослых особей гельминтов [136]. M2-макрофаги обеспечивают благоприятный исход при асептическом воспалении. Это происходит за счет подавления ими вялотекущего воспалительного процесса (например, в жировой ткани при метаболическом синдроме) [135].

Известно, что воспаление сопровождается гипоксией, а гипоксия – приводит к ацидозу, альтерации и воспалению [10], что не может не отражаться на дифференциации моноцитов на клетки с провоспалительным и противовоспалительным фенотипами.

### **1.3 Адаптация к гипоксии и дифференциация моноцитов**

Гипоксия (от греч. *hupo* – мало и лат. *oxigenium* – кислород) – типовой патологический процесс, развивающийся при недостаточном поступлении кислорода в ткани или при нарушении его использования клетками в процессе биологического окисления. Постоянное обеспечение организма кислородом необходимо для правильного развития тканей, поддержания их гомеостаза и функционирования всех органов. Кислород служит основным элементом в жизнеобеспечении и регуляции всех жизненно-важных процессов – мембранного транспорта, внутриклеточной передачи сигналов, экспрессии генов и др. [161].

Гипоксия является важной особенностью очага воспаления. Она возникает, когда нарушается баланс между поступлением и потреблением кислорода в очаге на фоне нарушений микроциркуляции (венозной гиперемии и стаза); характерна на участках как острого, так и хронического воспаления тканей, например, при заживлении ран или росте опухолей [161]. Зрелые моноциты мигрируют к местам воспаления и инфекции и дифференцируются в воспалительные макрофаги или дендритные клетки [69, 120, 193]. При активации иммунного ответа моноциты

при созревании проходят через различные органы, где они подвергаются широким колебаниям концентрации кислорода, например, через костный мозг, сосудистое русло и эндотелий, прежде чем они, наконец, мигрируют в ткани и органы. Гипоксия является фактором регуляции моноцитопоэза. Показано, что в костном мозге клетки-предшественницы образовывали более крупные колонии в условиях гипоксии ( $<5\% \text{O}_2$ ), чем при нормоксии [158]. Данные литературы также свидетельствуют о том, что покоящиеся стволовые клетки выживают в «гипоксических нишах» гемопоэтической ткани, тогда как нейтрофильные/моноцитарные предшественники высокочувствительны к недостатку кислорода [72, 179, 194].

В участках гипоксии клетки вынуждены немедленно адаптироваться к низкому уровню оксигенации. Механизм этой адаптации и происходящие при этом активация и миграция клеток еще полностью не изучены [104, 179].

Макрофаги обладают самым высоким фагоцитарным потенциалом. Они презентуют (представляют) антигены в комплексе с МНС II Т-лимфоцитам и другим иммунокомпетентным клеткам, и через цитокины привлекают в область воспаления другие макрофаги, гранулоциты, НК-клетки и Т-лимфоциты. Более того, концентрация кислорода в организме человека сильно варьирует во многих анатомических отделах, например, в лимфатической жидкости и легких [104]. Такие функции, как транспорт катионов и синтез макромолекул, а также специализированные виды деятельности иммунных клеток, зависят от энергообеспечения [104, 109]. Моноциты и макрофаги играют решающую роль в патогенезе воспалительных заболеваний и генерируют энергию в виде АТФ, необходимую для процессов адгезии, миграции, а также активации и выполнения эффекторных функций (обработка и презентация антигена, фагоцитоз). В условиях достаточной оксигенации энергообеспечение клеток происходит через окислительное фосфорилирование в процессе аэробного гликолиза. Внеклеточное микроокружение в зоне альтерации, например, в участках ишемии, ранений и гематом, характеризуется низким уровнем кислорода и доступностью глюкозы, что приводит к нарушению образования АТФ [75, 147]. Клеткам необходимо

адаптироваться к такого рода условиям, чтобы оставаться функционально активными. Адаптация к гипоксии в основном обусловлена эффектами HIF (hypoxia inducible factor) типов 1 и 2 (HIF-1 и HIF-2) [93].

### 1.3.1 HIF-1 фактор и воспаление

Реакция на острый дефицит кислорода опосредуется через HIF-1. HIF-1 впервые был обнаружен в ядерном экстракте клеточной линии гепатомы человека Hep3В [169], благодаря его способности вызывать экспрессию эритропоэтина (ЭПО) в почках и печени. В ответ на гипоксию синтезируется ЭПО, который, в свою очередь, активирует созревание эритроцитов. Это способствует увеличению содержания кислорода в крови и уменьшает влияние гипоксии [78].

HIF-1 представляет собой гетеродимер, состоящий из кислород-регулируемой альфа-субъединицы и конститутивно экспрессируемой бета-субъединицы. Количество альфа-субъединиц в основном регулируется семейством пролилгидроксилаз. В настоящее время описаны три связанных HIF-альфа субъединицы (HIF-1альфа, HIF-2альфа и HIF-3альфа). Наиболее исследованной субъединицей является HIF-1альфа [99, 162].

Активация HIF-1 связана с переключением клетки на метаболизм по пути анаэробного гликолиза. Это явление характерно для популяций клеток, которые являются условно провоспалительными: нейтрофилов, M1-макрофагов, Th1-, Th2-, Th17-, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. HIF-1 определяет экспрессию на них костимуляторных молекул и внутриклеточный синтез факторов агрессии [172].

Про активацию HIF-2 в клетках иммунной системы известно гораздо меньше. В настоящее время доказана роль HIF-2 в поляризации макрофагов в M2-фенотип, в дифференциации и поддержании жизнеспособности опухоль-ассоциированных макрофагов [111].

Активность HIF-1 в основном регулируется избытком субъединицы HIF-1альфа [99, 162]. Так как HIF-1 активно участвует в адаптации клеточного метаболизма к гипоксическому состоянию, также было предположено, что HIF-1



является важным промотором воспалительных реакций, которые чаще всего требуют, чтобы иммунные клетки адаптировались к кислородно-дефицитной среде в очаге повреждения и микроциркуляторных расстройств [170].

Действительно, было обнаружено, что HIF-1 регулирует синтез и секрецию многих провоспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа, IL-8 и VEGF-A [110]. Кроме того, обнаружено, что HIF-1 участвует в перекрестной реакции с другим основным провоспалительным путем внутриклеточного сигналинга – посредством ядерного фактора NF-κB [157]. Медиаторами, индуцированными гипоксией через NF-κB-путь, являются IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-альфа, макрофагальный воспалительный белок-2 (MIP-2), молекула межклеточной адгезии (ICAM), молекула адгезии сосудистого эндотелия (VCAM), хемокин CCL5 (RANTES), индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) [157]. Хотя исследователями основное внимание уделяется роли HIF в патогенезе патологических процессов, ассоциированных с гипоксией, обнаружено, что он может способствовать воспалительным функциям миелоидных клеток в нормоксических условиях [67, 96]. Показано, что HIF-1α может быть активированным в миелоидных клетках провоспалительными стимулами, такими как липополисахариды и TNF-альфа [94].

HIF-1α широко экспрессируется и обнаруживается практически во всех клетках врожденного и адаптивного иммунитета, включая макрофаги [95], нейтрофилы [152], дендритные клетки [105] и лимфоциты [106]. Экспрессия HIF-2α тканеспецифична и осуществляется лишь в ряде клеток: эндотелиальных, жировой ткани, почек, кишечника и некоторых иммунocyтах [71].

Связь между гипоксической и воспалительной реакциями строго контролируется. Гипоксия и бактериальные инфекции приводят к повышению активности NF-κB в фагоцитах, что, в свою очередь, индуцирует транскрипцию мРНК HIF-1α [52, 153, 163]. Кроме того, HIF-1α-дефицитные макрофаги проявляют пониженную способность уничтожать бактерии. Исследования с использованием различных патогенов указывают на потенциальную роль гипоксии и HIF-1α в фагоцитозе бактерий [107].

При гипоксии NIF-1альфа стабилизируется, а в случае моноцитов/макрофагов (в зависимости от состояния их дифференциации) транслоцируется в ядро, где он димеризуется с субъединицей NIF-1бета [107]. В целом, незрелые моноциты, подверженные низким концентрациям кислорода в костном мозге [95], должны обладать способностью адаптироваться к гипоксии посредством изменений энергетического обмена.

### 1.3.2 Дифференциация моноцитов и макрофагов в условиях гипоксии

В процессе дифференциации моноциты мигрируют по хемотаксическому градиенту и быстро адаптируются к местным гипоксическим областям, которые обнаруживаются в участках ишемии (инфаркт миокарда), хронического воспаления (в атеросклеротических бляшках), заживающих ранах и участках с бактериальной инфекцией [144]. Они представляют собой ранний мононуклеарный фагоцитарный компонент инфильтрата лейкоцитов. Моноциты, макрофаги и дендритные клетки (ДК) являются мощными регуляторами иммунных и воспалительных реакций, поскольку они первыми реагируют на появление инфекционного агента [146]. В культуре клеток моноциты могут дифференцироваться в макрофаги при стимуляции M-CSF или в незрелые миелоидные дендритные клетки при стимуляции GM-CSF (или IL-4). ДК являются наиболее эффективными профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК) [89, 155], тогда как макрофаги в основном используют фагоцитоз для быстрого устранения патогенов и дополнительно регулируют воспалительные реакции путем продукции провоспалительных или противовоспалительных цитокинов [89, 97, 116]. Начальные процессы трансэндотелиальной миграции и дифференциации моноцитов человека *in vivo* представляют собой взаимодействие моноцитов с соседними клетками, эндотелием и постоянное влияние локальной микросреды [113, 144].

Макрофаги мигрируют по хемотаксическому градиенту до тех пор, пока не

достигнут гипоксического участка, в котором прекращается их дальнейшая дифференциация. На этом участке они функционируют как фагоциты, очищающие ткани от «мусора» [91]. Следует отметить, что хемоаттрактантный белок моноцитов MCP-1 ингибируется, а экспрессия и функция chemokine receptor type 4 (CXCR4) повышаются при дифференциации моноцитов в макрофаги в ответ на гипоксию. Следовательно, хемотаксическая реакция моноцитов и процесс их созревания в макрофаги может регулироваться гипоксией [165]. При хронической гипоксии моноциты продолжают свое созревание в макрофаги при действии HIF-1альфа [143]. Эти события интерпретируются как имеющие решающее значение для созревания, выживания и функции линий моноцитов-макрофагов в условиях хронической гипоксии. Одним из основных ответов на гипоксию является активация ангиогенеза, приводящая к увеличению кровотока, в целях поддержания гомеостаза кислорода [143].

Таким образом, гипоксия изменяет активность моноцитов и тканевых макрофагов. Благодаря этому, мигрирующие макрофаги секвестрируются в воспаленной ткани и адаптируются к гипоксии. Важный вклад в этот процесс вносят HIF-1 и HIF-2, которые активируют ангиогенез, приводящий к увеличению кровотока и оксигенации [143].

#### **1.4 Моноциты/макрофаги в патогенезе ишемической болезни сердца**

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности и инвалидности во всем мире. Ведущая роль в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний принадлежит ишемической болезни сердца [33].

При недостаточности функций сердца развивается циркуляторная гипоксия вследствие снижения объемной скорости кровотока и количества крови, притекающей к органам и участкам тела. Уменьшается объем доставляемого кислорода и обнаруживается нарастание утилизации кислорода в тканях. Наряду с этим, напряжение кислорода в артериальной крови ( $p_aO_2$ ), процент

оксигемоглобина и кислородная емкость крови сохраняются нормальными [14].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – патологическое состояние, характеризующееся абсолютным или относительным нарушением кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий [45]. Моноциты и макрофаги располагаются и накапливаются как в здоровом, так и в поврежденном миокарде, где они выполняют различные функции, а срок их пребывания может варьироваться от нескольких часов до нескольких месяцев [150].

Однако гетерогенность моноцитов и их связь с ИБС остаются недостаточно изученными. Соотношение CD16-позитивных и CD16-негативных моноцитов в крови значительно изменяется при ИБС. Исследования показали, что в крови больных ИБС повышено содержание TNF-альфа, который является активным стимулятором созревания моноцитов/макрофагов. Во время эпизодов гипоксии, например, вызванных инфарктом миокарда и инсультом, увеличение количества CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в крови коррелировало с тяжестью заболевания и плохим прогнозом, поскольку клетки проявляют повышенную провоспалительную активность, способны взаимодействовать с эндотелием сосудов. На ранней стадии заболевания атеросклеротическая бляшка представляет собой инфильтрат, состоящий преимущественно из CD16-позитивных клеток [171].

Макрофаги присутствуют в проводящей системе сердца, крупных артериях и венах и в виде периартериальных клеток в периферической сосудистой системе. Они имеют тесную связь с эндотелием во время воспаления, репарации, инфекции, при атеросклерозе и злокачественном опухолевом росте [70]. Сердечные макрофаги эмбрионального происхождения с возрастом постепенно заменяются моноцитами, поступающими из костного мозга [145]. Во время воспаления и регенерации, например, после перенесенного инфаркта миокарда, привлеченные из крови моноциты играют важную роль в увеличении проницаемости сосудов, ангиогенезе и образовании рубцов. В ответ на ишемию эндотелиальные клетки начинают продуцировать VEGF, который активирует

продукцию хемокина MCP-1 в эндотелии и гладкомышечных клетках. Это, в свою очередь, стимулирует миграцию моноцитов в повреждаемую ткань. В периартериальном пространстве макрофаги продуцируют ростовые факторы, которые повышают пролиферацию гладкомышечных клеток, а также способствуют разрушению протеазами межклеточного матрикса. При этом активируется NF- $\kappa$ B-путь, что выражается развитием коллатеральных микрососудов и устранением или снижением степени ишемии и гипоксии [76].

В эксперименте на мышах с хронической сердечной недостаточностью обнаружено, что после лигирования коронарной артерии различные популяции макрофагов распространяются в неишемические области миокарда. Это, по мнению авторов, связано с местной генерацией клеток, а также экстрамедуллярным гемопоэзом и зависит от активации симпатической нервной системы [51].

### **1.5 Моноциты/макрофаги в патогенезе туберкулеза и хронической обструктивной болезни легких**

**Туберкулез** – хроническое бактериальное инфекционное заболевание, вызванное *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), характеризующееся поражением различных органов и тканей (легких, кожи, костей, почек и др.). Врожденный иммунитет («первая линия» противoinфекционной защиты) играет ключевую роль в защите хозяев от МБТ. Среди иммунных врожденных клеток, участвующих в этом виде специфической резистентности, макрофаги являются первичными регуляторами баланса про- и противовоспалительного ответа, чтобы обеспечить контроль за репликацией бактерий и ограничить степень повреждения ткани после внедрения патогена [149]. Они выполняют эти задачи в соответствии с высокой степенью их фенотипической пластичности в ответ на экзогенную стимуляцию в тканях. Примечательно, что МБТ проявляют способность влиять на созревание, активность и фагоцитарную функцию макрофагов, что приводит к эффективному их уклонению от факторов иммунной агрессии организма-хозяина

[27].

В легком изначально содержатся альвеолярные макрофаги эмбрионального происхождения, после рождения их пул постоянно пополняется посредством поступления моноцитов из костного мозга в циркуляцию и привлечения моноцитов из крови, дифференцирующихся в макрофаги. Продукция и созревание альвеолярных макрофагов регулируются транскрипционным фактором PPAR $\gamma$ . Кроме того, дыхательные пути содержат антиген-реагирующие бронхиальные дендритные клетки и интерстициальные макрофаги [87].

Альвеолярные макрофаги расположены в гипофазе надклеточного жидкого слоя, выстилающего респираторный отдел изнутри. Они мигрируют из одной альвеолы в другую по внутренней их поверхности через поры Кона. Помимо функции противoinфекционной защиты (участия в иммунитете) им отводится роль в самоочищении легких (поглощении чужеродных частиц), элиминации избытка сурфактанта. Альвеолярные макрофаги играют важную роль в регулировании оборота поверхностно-активных веществ – протеолипидов через локальную секрецию GM-CSF. Альвеолярные макрофаги отличаются от других тканевых макрофагов. В частности для них не характерна продукция матриксных металлопротеиназ MMP-1, MMP-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы TIMP-1, а медиаторами межклеточных взаимодействий с эпителиальными клетками и Т-лимфоцитами нижних дыхательных путей являются IL-10, TGF- $\beta$  и антагонист к рецептору IL-1 (IL-1Ra) [23, 87].

При туберкулезе M1-макрофаги активируются Т-клеточным цитокином IFN- $\gamma$ , что способствует продукции провоспалительных цитокинов, образованию активных форм азота и кислорода и уничтожению возбудителя. Эти секреторные продукты и протеолитические ферменты гранул отвечают также за гибель клеток-хозяина, казеизацию, фиброз, а также опосредуют развитие осложнений. Хронические воспалительные реакции с участием M1 и M2 могут приводить к слиянию макрофагов и образованию гигантских клеток. В образовании гранулем в легких участвуют моноциты, гранулоциты и лимфоциты, в том числе цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки. Показано, что статус

активации и M1/M2-поляризация макрофагов имеют решающее значение для развития иммунных реакций хозяина против инвазивных патогенов [123]. МБТ обладают способностью модулировать поляризацию макрофагов. У макаки и человека в макрофагах туберкулезных гранул обнаружена значительная коэкспрессия провоспалительных и противовоспалительных маркеров [133]. Однако макрофаги неспособны убивать высокопатогенные штаммы МБТ. Выявлено, что IL-6 классически связан с поляризацией M1, но может ингибировать транскрипцию подмножества генов, чувствительных к IFN-гамма [55].

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 T-клеточного ответа [35]. Исследование внутриклеточной продукции цитокинов выявило значительное снижение у больных туберкулезом относительного количества моноцитов, продуцирующих TNF-альфа, а также существенное увеличение числа моноцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10, что явно указывает на изменение регуляторной функции клеток. При этом, если в крови у здоровых доноров преобладают моноциты с внутриклеточным TNF-альфа, то у больных туберкулезом регистрируется сдвиг в сторону клеток, продуцирующих IL-10, то есть обладающих иммуносупрессорной активностью [195]. Поскольку инфицирование моноцитов/макрофагов МБТ сопровождается запуском продукции TGF-бета и IL-10 [20] и переключением с Th1- на Th2-иммунный ответ [19], то увеличение популяции CD16-позитивных моноцитов у больных туберкулезом легких, возможно, является результатом активации клеток в условиях смещения цитокинового баланса в сторону противовоспалительных или иммуносупрессорных медиаторов [4, 9].

*Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)* по прогнозам ВОЗ к 2020 г. выйдет на третье место среди причин смертности населения многих стран мира. Данная патология представляет собой гетерогенное заболевание, которое

характеризуется воспалительной реакцией на вдыхаемые вредные частицы и газы. Исследования показали, что макрофаги играют ключевую роль в патогенезе ХОБЛ [37]. Наблюдается заметное увеличение (в 5-10 раз) числа макрофагов в дыхательных путях, паренхиме легких, бронхоальвеолярной лаважной жидкости и мокроте у пациентов с ХОБЛ [42, 50]. Макрофаги активируются сигаретным дымом и другими раздражителями для освобождения медиаторов воспаления. Существует положительная корреляция между числом макрофагов в дыхательных путях и тяжестью ХОБЛ [1]. Профицит макрофагов может быть результатом увеличения пула обновленных клеток, локальной пролиферации или локального выживания макрофагов. При этом макрофаги имеют очень низкий уровень пролиферации в легких [188], следовательно, должны дифференцироваться из мигрирующих моноцитов крови.

Основываясь на ассоциации макрофагов с воспалением и разрушением тканей при ХОБЛ, можно было бы ожидать, что при этой болезни они поляризуются в направлении провоспалительного фенотипа M1. Действительно, поскольку противовоспалительные макрофаги M2 обладают большей способностью к фагоцитозу, чем макрофаги M1, наблюдаемое снижение активности фагоцитоза при ХОБЛ соответствует сдвигу в сторону провоспалительного фенотипа M1. В соответствии с этими данными сообщалось, что провоспалительные макрофаги (характеризующиеся высоким уровнем продукции TNF-альфа) преобладают в индуцированной мокроте у пациентов с ХОБЛ [88, 137].

Привлечение моноцитов в легкие также является важным шагом в развитии ХОБЛ [128]. Моноциты секретируют различные макромолекулы и низкомолекулярные продукты, которые опосредуют воспаление и репарацию. Экспрессия генов этих секреторных продуктов и индукция их высвобождения зависят от локальных сигналов в микроокружении [182]. Известно, что различные цитокины, хемокины и молекулы адгезии, специфичные для моноцитов, вовлечены в активацию клеток моноцитарного ряда, связываются со стимулированным эндотелием и обеспечивают миграцию моноцитов в ткани



[115].

Моноциты, выделенные у пациентов с ХОБЛ, продуцируют значительно больше ММР-9, но меньше IL-8 по сравнению с контролем [62]. LPS-стимуляция этих клеток при ХОБЛ приводит к значительному усилению высвобождения IL-6 и MCP-1 из моноцитов, в то время как моноциты, выделенные у здоровых лиц, высвобождают более высокий уровень ICAM-1. Хемотаксическая активность циркулирующих моноцитов у пациентов с ХОБЛ в стабильном клиническом состоянии не увеличивается, а скорее подавляется [62]. Вышеперечисленные воспалительные агенты, такие как LPS и GM-CSF или гипоксические условия, ингибируют апоптоз макрофагов (нейтрофилов). Таким образом, любое подавление апоптоза макрофагов или дисрегуляция поглощения макрофагов может привести к хроническому воспалению и повреждению ткани, накоплению макрофагов в легких пациентов с ХОБЛ [54].

### **1.6 Галектин-2 и его роль в поляризации макрофагов**

Агентами, регулирующими жизненный цикл клетки, являются низкомолекулярные белки семейства лектинов – галектины. На сегодняшний день у млекопитающих обнаружено до 16 членов семейства галектинов, 12 из которых были идентифицированы у человека [84, 185]. Галектины представляют собой семейство бета-галактозид-связывающих белков, основной домен которых содержит домен распознавания углеводов (CRD). Через CRD галектины могут связываться с многочисленными углеводными лигандами, поэтому имеют широкую область распределения в клетках и тканях [84, 185]. Члены семейства галектинов могут связываться с различными гликоконъюгатами клеточной поверхности или внеклеточного матрикса [125, 185] и, таким образом, играют роль в активации клеток, секреции цитокинов, адгезии, миграции и апоптозе [126]. Внутриклеточные галектины могут участвовать в сигнальных путях и модулировать биологические реакции. К ним относятся апоптоз, дифференциация клеток и миграция клеток. Таким образом, галектины играют важную роль в

иммунных и воспалительных реакциях посредством регулирования гомеостаза и функций иммунных клеток [185].

Галектины опосредуют заживление ран и (в качестве примера негативного действия) развитие аутоиммунных заболеваний, рака, атеросклероза, дегенерацию нейронов [84, 98]. Исследования показали, что различные галектины отчетливо модулируют выделение цитокинов из моноцитов и макрофагов и индуцируют апоптоз моноцитов при воспалительных заболеваниях [83].

Галектин-2 представляет собой прототип галектина с одним CRD и экспрессируется эпителиальными клетками желудочно-кишечного тракта. Он может индуцировать Т-клеточный апоптоз по митохондриальному пути, связанному с выходом цитохрома С и активацией каспазы-3 и каспазы-9. Кроме того, галектин-2 стимулирует образование Т-лимфоцитов-хелперов типа 2 (Th2) [83].

Экспрессия галектина-2 в моноцитах связана с естественным снижением реваскуляризации у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца [84]. Галектин-2 действует как эндогенный лиганд, который индуцирует провоспалительные свойства в моноцитах и макрофагах, сопоставимые с эффектами экзогенных LPS. Галектину-2 для связывания с моноцитами требуется CD14. Моноциты с высокой экспрессией CD14 (классические и промежуточные) показывают более высокое связывание с галектином-2, чем моноциты с низкой экспрессией CD14 (неклассические). Инкубация человеческих моноцитов с галектином-2 приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-альфа, IFN-бета) и уменьшению экспрессии противовоспалительного цитокина TGF-бета [80]. Эти эффекты указывают на ключевую роль галектина-2 для активации провоспалительной активности моноцитов.

Галектин-2 также стимулирует поляризацию созревания макрофагов в направлении фенотипа, подобного M1. Есть подтверждения того, что миграция и подвижность моноцитов, а также макрофагов почти полностью блокируются галектином-2 [134]. Эти данные показывают, что галектин-2 поляризует моноциты и макрофаги в провоспалительные клетки M1, одновременно

предотвращая дифференциацию M2.

Таким образом галектин-2 является эндогенным лигандом для CD14 на моноцитах, ответственным за индукцию «провоспалительных» моноцитов и макрофагов.

### **1.7 Галектин-9 и его участие в дифференциации клеток**

Члены семейства галектинов структурно подразделяются на три группы. Галектин-1, 2, 7, 10 и 13 являются прототипами галектинов, тогда как галектин-3 является химерным. Напротив, галектин-4, 8, 9 и 12 относятся к подсемейству тандемного повторного типа, который характеризуется структурно наличием двух различных доменов распознавания углеводов с различными специфическими связями сахара, соединенными линкерным пептидом.

Галектин-9 был впервые описан в 1998 году как опухолевый антиген у пациентов с лимфомой Ходжкина [103]. Он является типом тандемного повтора галектина с двумя консервативными CRD, N-концом длиной 148 аминокислот и C-концом длиной 149 аминокислот. Между доменами существует соединительная последовательность, длина которой определяет три изоформы галектина-9: короткий галектин-9S, средний галектин-9M и длинный галектин-9L. Галектин-9 проявляет различные биологически активные функции, такие как хемоаттракция, индукция агрегации клеток, продукции супероксид-аниона и продление выживаемости эозинофилов [98]. Он может функционировать как проапоптотический фактор в различных клетках, включая активированные T-лимфоциты, тимоциты и опухолевые клетки [84, 192]. Галектин-9 также является потенциальным прогностическим фактором, поскольку он проявляет антиметастатические свойства при раке молочной железы [81]. Он экспрессируется в различных типах клеток, таких как T-лимфоциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, тучные клетки, макрофаги, астроциты и эозинофилы [84, 96]. Галектин-9 является LPS-чувствительным фактором, который может активировать промоторы гена воспалительных цитокинов в

моноцитах и макрофагах. В дополнение к его хорошо описанной роли в регуляции Т-клеток ранее сообщалось, что взаимодействие мышиного Tim3 с галектином-9, экспрессируемым макрофагами, инфицированными МБТ, приводит к активации макрофагов, секреции IL-1β и контролю внутриклеточного бактериального роста [184, 186]. Известно, что галектин-9 индуцирует образование M2-макрофагов и (также как и галектин-2) влияет на дифференциацию Th2-лимфоцитов [80].

Таким образом, моноциты играют важную роль в патогенезе иммунных и воспалительных реакций. Различные воспалительные и иммунорегуляторные цитокины экспрессируются активированными моноцитами и макрофагами. Эти клетки могут почти мгновенно реагировать на различные стимулы, включая LPS, IL-1β и другие цитокины, и подвергаются быстрому превращению из покоящихся моноцитов в активированные. Гены воспалительных цитокинов в покоящихся моноцитах/макрофагах также молчат, но быстро транскрибируются в компетентных клетках при стимуляции. Производство воспалительных цитокинов в моноцитах и макрофагах строго регулируется [186].

В настоящее время такие формы патологии, как ишемическая болезнь сердца, хроническая обструктивная болезнь легких и туберкулез легких, имеют высокую социальную значимость и распространённость среди населения. Это обосновывает необходимость более тщательного изучения патогенеза этих заболеваний, включая механизмы дифференциации моноцитов, которые непосредственно вовлечены в их развитие, прогрессирование и исход.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объект и материал исследования

Исследование выполнено в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии на базе кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН О.И. Уразова) и Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (руководитель – д-р мед. наук, профессор РАН Е.В. Удут).

В исследование было включено 40 больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) (29 мужчин и 11 женщин, средний возраст  $52,74 \pm 5,19$  лет); 16 больных с инфильтративным туберкулезом легких (ТЛ) (11 мужчин и 5 женщин, средний возраст  $47,81 \pm 4,12$  лет); 16 больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), не ассоциированной с бронхиальной астмой (12 мужчин и 4 женщины, средний возраст  $53,16 \pm 4,37$  лет), и 18 относительно здоровых доноров (12 мужчин и 6 женщин, средний возраст  $49,82 \pm 5,19$  лет), сопоставимых по полу и возрасту с группами пациентов.

Исследования проведены с разрешения локального этического комитета (протокол №5046 от 28.11.2016 г.). У всех испытуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Пациенты с ИБС, страдающие стенокардией напряжения преимущественно III (реже II или IV) функционального класса, которым проводилась операция коронарного шунтирования (КШ) в условиях искусственного кровообращения перед хирургическим вмешательством, были госпитализированы в отделение сердечно-сосудистой хирургии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт кардиологии» (директор – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ С.В. Попов; руководитель отделения – д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ В.М.

Шипулин; заведующий отделением – д-р мед. наук Б.Н. Козлов) с целью обследования и определения тактики дальнейшего лечения. Обследование, наблюдение за пациентами, лечение осуществлялось врачами кардиохирургического отделения.

Диагноз ИБС устанавливался на основании жалоб и анамнеза больного, данных электрокардиографии, ультразвукового исследования сердца, кардиовентрикулографии, в некоторых случаях – сцинтиграфии и эмиссионной компьютерной томографии миокарда. При наличии гемодинамически значимого стеноза двух и более коронарных артерий (более 75% от площади сечения сосуда) и/или полной окклюзии ствола левой коронарной артерии принималось решение об операции КШ.

Обязательным критерием включения больных ИБС в исследование было снижение степени насыщения гемоглобина кислородом в венозной крови менее 60% и парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ) в венозной крови менее 37 мм рт.ст. [2], а также наличие клинических признаков циркуляторной гипоксии: акроцианоз, включая цианоз носогубного треугольника, кончика носа и ушей, отеки нижних конечностей, слабость, одышка при умеренной физической нагрузке (по данным анализа медицинских карт).

Пациенты с ХОБЛ неаллергической природы в стадии ремиссии находились на диспансерном учете пульмонологического отделения ОГАУЗ «Городская клиническая больница №3 им. Б.И. Альперовича» (главный врач – д-р мед. наук, профессор А.П. Кошель, зав. отделением – врач-пульмонолог высшей категории И.В. Березко). Все пациенты находились на стационарном плановом обследовании в пульмонологическом отделении в период с 2017 по 2019 гг. Обследование и наблюдение за пациентами осуществлялось врачами пульмонологического отделения. Диагноз устанавливался на основании данных анамнеза, клинической картины заболевания (кашель, продукция мокроты, характер одышки, аускультативная картина), рентгенологических данных и показателей функции внешнего дыхания ( $ОФВ_1$  – объем форсированного выдоха за 1 с,  $ОФВ_1/ФЖЕЛ$  – индекс Тиффно, или отношение  $ОФВ_1$  к форсированной

жизненной ёмкости легких). Обследование пациентов с ХОБЛ включало стандартные методы: сбор анамнеза, заполнение САТ- и mMRC-тестов, объективный осмотр, проведение общеклинических исследований (общий и биохимический анализы крови, ЭКГ), спирометрии с бронходилатационным тестом, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, эхокардиография и (по показаниям) проведение бронхофиброскопии с забором бронхоальвеолярного лаважа.

Критерием включения больных ХОБЛ в исследование было снижение показателей спирометрии  $ОФВ_1$  и  $ОФВ_1/ФЖЕЛ <75\%$  (со снижением степени насыщения гемоглобина кислородом в артериальной крови  $<95\%$  и венозной крови  $<60\%$  [2, 12]) при наличии следующих признаков дыхательной недостаточности (гипоксии): одышка экспираторного характера, кашель, слабость, центральный цианоз кожных покровов и слизистых оболочек (по данным анализа медицинских карт).

Определение соответствия клинических данных пациентов критериям включения в исследование и взаимодействие с пациентами осуществлялось при содействии сотрудников кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России канд. мед. наук, ассистента А.А. Булановой (заведующий кафедрой – д-р мед. наук, профессор Е.Б. Букреева).

Больные с впервые выявленным инфильтративным ТЛ включались в исследование после приема в поликлиническое отделение ОГАУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр» (главный врач – Е.А. Крук, заведующий отделением – врач-фтизиатр высшей категории И.И. Правдина) с целью обследования и до начала противотуберкулезной терапии. Диагноз инфильтративного ТЛ устанавливался на основании жалоб и анамнеза больного, данных лабораторного исследования и микроскопического исследования мокроты, результатов рентгенографии или компьютерной томографии грудной клетки.

Критерием включения больных ТЛ в исследование было снижение

жизненной емкости легких (ЖЕЛ) менее 85%, минутной вентиляции легких и  $ОФВ_1$  менее 75% (со снижением степени насыщения гемоглобина кислородом в артериальной крови  $<95\%$  и венозной крови  $<60\%$  [2, 12]) при наличии признаков дыхательной недостаточности (гипоксии): кожные покровы бледные с серым оттенком, центральный цианоз, инспираторная одышка, одутловатость (пастозность) лица (по данным анализа медицинских карт).

Критериями исключения больных ИБС, ХОБЛ и ТЛ из исследования были возраст старше 65 лет или младше 45 лет, наличие гематологических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний, мегалобластной или гипопластической анемии, вирусного гепатита, ВИЧ-инфекции, острого воспалительного процесса в момент исследования или менее чем за 1 месяц до его проведения, лечение антибактериальными, противовоспалительными и иммуномодулирующими средствами, отказ от исследования, а также наличие ХОБЛ и ТЛ у больных ИБС и наличие ИБС у пациентов с ХОБЛ и ТЛ.

Во всех исследуемых группах утром натощак забирали 8 мл венозной крови, которую стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл).

У больных ХОБЛ и ТЛ забор крови проводился утром натощак при поступлении пациента в стационар.

У больных ТЛ кровь забиралась до начала проведения противотуберкулезной терапии.

У больных ИБС взятие крови проводили в день операции при поступлении больного в операционный блок. Во время операции сразу после осуществления доступа к сердцу путем срединной стернотомии и до подключения аппарата искусственного кровообращения забирали 2 мл красного костного мозга непосредственно из разреза грудины путем соскабливания его шпателем с поверхности распила кости и стабилизировали суспензию клеток гепарином (25 МЕ/мл).

## **2.2 Иммунофенотипирование моноцитов**



Иммунофенотипирование моноцитов осуществляли методом проточной цитофлуориметрии в цельной крови и костном мозге после предварительного удаления эритроцитов лизирующим буфером.

Деструкция эритроцитов в цельной крови и костном мозге проводилась путем осмотического лизиса в гипотонической среде с применением коммерческого лизирующего раствора, согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем (FACS Lysingsolution («BD Biosciens», США).

В полученной после лизиса эритроцитов суспензии клеток определяли относительное содержание классических ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), промежуточных ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ), неклассических ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) и переходных ( $CD14^{+}CD16^{-}$ ) моноцитов методом проточной лазерной двухцветной цитофлуориметрии, принимая за 100% все клетки, положительные по CD14.

*Принцип метода* основан на регистрации светорассеяния и флуоресценции света луча лазера при прохождении через него клетки в струе жидкости [159]. Клеточная суспензия, предварительно меченная флуоресцирующими моноклональными антителами (МКАТ), попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют интенсивность светорассеяния и интенсивность свечения флуоресцентных меток.

Для CD-типирования моноцитов использовали МКАТ к CD14 и CD16, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (CD14-FITC) и фикоэритрином (CD16-PE), согласно инструкциям производителя («BD Biosciens», США). К 100 мкл полученной клеточной суспензии добавляли специфические МКАТ 16 мкл для CD14-FITC и 4 мкл для CD16-PE («BD Biosciens», США). Инкубировали пробы в течение 30 мин при температуре  $+3-5^{\circ}\text{C}$  в защищенном от света месте. После этого клетки отмывали 1 раз в 2 мл Cell-WASH-solution BD («Becton Dickinson», США), центрифугируя 5 мин при 250g. К полученному осадку добавляли 300 мкл окрашивающего буфера Stain-Buffer («Becton Dickinson», США). После проведения всех вышеуказанных процедур пробы были готовы к измерению на проточном цитофлуориметре. Измерения проводили на проточном

цитофлуориметре «Accuri C6» («BD Biosciens», США), снабженном аргоновым лазером ( $\lambda=488$  нм) и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения «BD Cell Quest for Mac OS® X».

Образцы клеточных суспензий анализировали по четырем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), боковому светорассеянию (SSC), двум показателям флуоресценции – зеленой (FITC – 530 нм) и оранжевой (PE – 585 нм), выявляемых на FL1- и FL2-каналах, где прямое светорассеяние характеризует размер клетки, боковое светорассеяние – цитоплазматические и мембранные особенности клетки. Результаты выражали в процентах от общего числа клеток. В исследовании применяли изотипические контроли МКАТ («BD Biosciens», США) для CD14 (мышинный IgG2a, каппа), меченные FITC, и для CD16 (мышинный IgG1, каппа), меченные PE, позволяющие идентифицировать границы неспецифического связывания рецепторов клеток образца со специфическими антителами. По данным исследования изотипического контроля устанавливали квадранты гейтирования [65].

### **2.3 Определение клеточности в образцах клеточных суспензий крови и костного мозга**

Для определения клеточности полученной суспензии осуществлялся подсчет ядродержащих клеток крови и костного мозга с помощью камеры Горяева [29].

Обработанные лизирующим раствором (для разрушения эритроцитов) образцы суспензий клеток крови или костного мозга после отмычки буфером Cell-WASH-solution BD («Becton Dickinson», США) разводили в 20 раз раствором уксусной кислоты. Для этого в пробирку с 0,4 мл 3-5% уксусной кислоты вносили 0,02 мл клеточной суспензии, содержимое пробирки перемешивали и заполняли камеру Горяева. После оседания форменных элементов (через 1-2 мин) подсчитывали ядродержащие клетки в 100 больших квадратах по всей

поверхности сетки.

Расчет количества ядродержащих клеток в 1 л клеточной суспензии производили, исходя из его разведения (в 20 раз), количества подсчитанных квадратов (100) и объема 1 квадрата (1/250 мкл) по формуле:

$$X = \frac{a \times 20 \times 250}{100} \times \frac{10^6}{л} = a \times 50 \times \frac{10^6}{л} = \frac{a \times 1000}{20} \times \frac{10^9}{л} = \frac{a}{20} \times \frac{10^9}{л},$$

где X – концентрация клеток в 1 л суспензии; а – количество сосчитанных ядродержащих клеток в 100 больших квадратах камеры.

В случае, если клеточность суспензии была больше, чем  $1 \times 10^6$  на 100 мкл, ее разбавляли Cell-WASH-solution BD («Becton Dickinson», США) в соответствующее число раз для достижения величины  $1 \times 10^6$  на 100 мкл.

## **2.4 Измерение концентрации иммунорегуляторных медиаторов в плазме крови и надосадке костного мозга**

Иммуноферментный анализ (ИФА) основан на специфическом взаимодействии антигена и антител с предварительной иммобилизацией (фиксацией) одного из компонентов реакции (антигена или антител) на твердофазном носителе в лунках полистироловых планшетов, стрипов и выявлении образовавшегося комплекса «антиген-антитело» посредством ферментной метки (конъюгата).

Выявление образовавшегося комплекса осуществляется по измерению интенсивности окраски – оптической плотности субстратной смеси, содержащей вещество, с которым реагирует фермент, индикатор, изменяющий цвет под действием продуктов реакции «фермент-субстрат». Оптическую плотность определяли с помощью сканирующего спектрофотометра для микропланшетов «Анализатор иммуноферментный фотоэлектрический» («Multiskan EX», Финляндия) при длине волны 450 нм, единицы оптической плотности, с помощью калибровочного графика, пересчитывали в концентрацию вещества.

*Принцип метода.* Метод определения основан на связывании молекулы

человеческого белка с мышиными МКАТ к исследуемым цитокинам, сорбированными на твердой фазе микропланшета. В лунках при добавлении исследуемого образца плазмы крови или надосадка костного мозга (миелоплазмы) во время первой инкубации происходит связывание цитокина с МКАТ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязанный материал удаляется отмывкой. Связавшийся цитокин взаимодействует во время второй инкубации с конъюгатом №1 (биотинилированные антитела к исследуемому цитокину человека). Несвязанный конъюгат №1 удаляется отмывкой. На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин-пероксидаза хрена). Несвязанный конъюгат №2 удаляется отмывкой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Ферментативная (цветная) реакция проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции. Степень окрашивания (желтого) пропорциональна концентрации исследуемого цитокина в анализируемых образцах. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента.

Результат оценивается спектрофотометрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей продукты жизнедеятельности клеток («0 доза») и стандартных растворов исследуемых биомолекул с известной концентрацией. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация медиатора в анализируемых образцах (для гипоксией индуцируемого фактора (HIF)-1 альфа – нг/мл, для всех остальных цитокинов – пг/мл) [30].

При проведении исследований плазму крови и надосадок костного мозга после центрифугирования при 3000 об/мин консервировали и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  с целью дальнейшего определения методом иммуноферментного анализа концентрации цитокинов (интерлейкинов (IL) IL-1 бета, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, фактора некроза опухоли (TNF) альфа, интерферона (IFN) гамма, колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF)), галектинов

2 и 9, ИФ-1альфа. С данной целью использовали следующие коммерческие наборы для иммуноферментного анализа согласно инструкциям фирм-производителей: «IL-1 бета-ИФА-БЕСТ», «IL-4-ИФА-БЕСТ», «IL-6-ИФА-БЕСТ», «IL-10-ИФА-БЕСТ», «альфа-TNF-ИФА-БЕСТ» и «гамма-IFN-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-БЕСТ» (г. Новосибирск); «Human IL-13 Platinu ELISA» («eBioscience», Австрия), «RayBio Human M-CSF ELISA Kit» («RayBiotech», США), «Human ИФ-1альфа ELISA Kit», «Human Galectin-2 ELISA Kit» и «Human Galectin-9 ELISA Kit» («Clou-Clone-Corp», США).

## **2.5 Статистический анализ результатов исследования**

Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью программы SPSS и Microsoft Excel. Для статистического описания результатов исследования данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (1-го и 3-го квартилей:  $Q_1$  и  $Q_3$ ). Для выполнения сравнительного анализа использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни с введением поправки Бенджамини-Хохберга. Для выявления корреляционных связей линейной зависимости между двумя количественными показателями применяли вычисление рангового коэффициента корреляции Спирмена. Силу зависимости определяли по величине коэффициента корреляции  $r$ : сильную связь при  $r > 0,8$ , среднюю связь при  $0,6 < r < 0,8$ ; слабую связь при  $r < 0,6$ .

Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Субпопуляционный состав моноцитов крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких

При анализе полученных данных выяснено, что наиболее значительные изменения субпопуляционного состава моноцитов в крови регистрировались у пациентов с хронической обструктивной болезнью (ХОБЛ), у которых определялось увеличение численности  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических и дефицит  $CD14^{++}CD16^{+}$  промежуточных,  $CD14^{+}CD16^{+}$  неклассических и  $CD14^{+}CD16^{-}$  переходных моноцитов по отношению к группе здоровых доноров (таблица 1).

Таблица 1 - Субпопуляционный состав моноцитов крови у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и туберкулезом легких (Me (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>))

Субпопуляции моноцитов, %	Группа обследуемых лиц			
	ИБС	ХОБЛ	Туберкулез легких	Здоровые Доноры
1	2	3	4	5
Классические $CD14^{++}CD16^{-}$	57,23 (49,60 – 66,42) $p_{1-2}=0,014$	80,56 (77,60 – 83,55) $p_{2-4}=0,013$	58,55 (47,21 – 70,74) $p_{2-3}=0,012$	67,75 (64,34 – 70,65)
Промежуточные $CD14^{++}CD16^{+}$	25,27 (15,78 – 31,39) $p_{1-4}=0,038$ $p_{1-2}=0,045$	10,38 (9,36 – 11,26) $p_{2-4}=0,042$	26,24 (22,38 – 42,88) $p_{3-4}=0,004$ $p_{2-3}=0,002$	14,36 (12,06 – 14,98)
Неклассические $CD14^{+}CD16^{++}$	9,10 (6,02 – 17,93)	6,03 (5,24 – 6,77) $p_{2-4}=0,011$	9,83 (6,81 – 14,50) $p_{2-3}=0,035$	10,07 (9,34 – 13,84)

1	2	3	4	5
Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	2,68 (2,63 – 4,09) p <sub>1-4</sub> =0,027	2,14 (1,41 – 3,92) p <sub>2-4</sub> =0,032	1,77 (1,36 – 3,74) p <sub>3-4</sub> =0,009	6,80 (5,03 – 6,87)

*Примечание.* *p* – уровень статистической значимости межгрупповых различий показателей, где группа 1 – пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС), группа 2 – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), группа 3 – больные туберкулезом легких (ТЛ), группа 4 – здоровые доноры.

У больных туберкулезом легких (ТЛ), также как и у пациентов с ишемической болезнью легких (ИБС), отмечалось увеличение числа CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> промежуточных моноцитов в крови в сравнении со здоровыми лицами на фоне дефицита CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> переходных клеток при нормальном содержании классических и неклассических моноцитов (таблица 1). При этом содержание классических моноцитов имело отрицательную корреляцию с долей промежуточных клеток в крови во всех группах больных (таблица 2).

Содержание неклассических моноцитов в крови во всех группах сравнения (и у больных, и у здоровых доноров) не коррелировало с числом промежуточных клеток. При этом только у здоровых доноров доля CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноцитов была негативно связана с содержанием переходных моноцитов, число которых коррелировало с количеством классических клеток в крови (таблица 2).

Таблица 2 - Корреляции между содержанием отдельных субпопуляций моноцитов в крови у больных ИБС, ХОБЛ и туберкулезом легких и в костном мозге у пациентов с ИБС

Здоровые доноры		
1	2	3
Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	r= -0,63 (p<0,05)	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
Неклассические CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	r= -0,67 (p<0,05)	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>

1		2		3	
Больные с ХОБЛ					
Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>		r= -0,59 (p<0,05)		Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	
Больные туберкулезом легких					
Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>		r= -0,72 (p<0,01)		Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	
Больные с ИБС					
Кровь			Костный мозг		
Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	r= -0,59 (p<0,05)	Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	r= -0,95 (p<0,01)	Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>
			Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	r= -0,64 (p<0,05)	Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>

*Примечание: r – коэффициент корреляции, p – уровень статистической значимости, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.*

### **3.2 Субпопуляционный состав моноцитов костного мозга у больных с ишемической болезнью сердца**

В костном мозге количество CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> переходных форм моноцитов у больных ИБС многократно превышало их содержание в крови, а численность классических и промежуточных клеток, напротив, была меньше, чем в крови (таблица 3).

При этом регистрировались отрицательные корреляции числа CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> переходных моноцитов с долей классических и промежуточных клеток в костном мозге у пациентов с ИБС (таблица 2). Количество неклассических моноцитов в костном мозге не было связанным с численностью других субпопуляций этих клеток и оказалось меньше, чем в крови (таблица 3).



Таблица 3 – Субпопуляции моноцитов в костном мозге в сравнении с их количеством в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, (Me (Q1 – Q3))

Субпопуляции моноцитов, %	Исследуемый материал	
	Кровь (n=40)	Костный мозг (n=40)
Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	57,23 (49,60 – 66,42)	43,44 (40,54 – 44,68) p=0,035
Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	25,27 (15,78 – 31,39)	0,16 (0 – 1,07) p<0,001
Неклассические CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	9,10 (6,02 – 17,93)	0,54 (0,35 – 1,07) p=0,002
Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	2,68 (2,63 – 4,09)	54,32 (52,83 – 56,08) p<0,001

*Примечание: p – уровень статистической значимости различий показателей крови и костного мозга.*

### **3.3 Медиаторный спектр плазмы крови у больных с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и туберкулезом легких**

Исследование и анализ концентрации цитокинов в плазме крови выявил у всех категорий больных избыток фактора некроза опухоли (TNF) альфа по сравнению с нормой и «нулевые» значения концентрации интерлейкина (IL)-4 у обследованных больных в отличие от группы здоровых доноров (таблица 4).

При этом концентрация IL-1бета, IL-10 и гипоксией индуцируемого фактора (HIF)-1альфа в крови у всех больных варьировала в пределах нормы (таблица 4).

Таблица 4 - Концентрация цитокинов, ИФ-1альфа и галектинов в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью и туберкулезом легких (Me (Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>))

Медиаторы, пг/мл	Группы обследуемых лиц			
	ИБС (n=40)	ХОБЛ (n=16)	ТЛ (n=16)	Здоровые доноры (n=18)
1	2	3	4	5
IL-1бета	2,06 (0,35 – 2,74)	1,62 (0 – 5,30)	1,94 (0,13 – 4,05)	1,21 (0 – 1,79)
IL-4	0	0	0	0,29 (0,08 – 1,26)
IL-6	2,10 (1,53 – 4,95)	2,45 (2,36 – 2,88) p <sub>2-4</sub> =0,039 p <sub>2-3</sub> =0,009	1,05 (0,96 – 1,66) p <sub>1-3</sub> =0,010	1,58 (1,09 – 2,14)
IL-10	24,00 (23,00 – 28,50)	27,50 (23,50 – 31,00) p <sub>2-3</sub> =0,009	20,50 (18,50 – 22,50) p <sub>1-3</sub> =0,008	19,50 (18,00 – 24,00)
IL-13	0,60 (0,41 – 0,82) p <sub>1-2</sub> =0,020	2,62 (1,20 – 7,58) p <sub>2-4</sub> =0,002 p <sub>2-3</sub> =0,040	0,81 (0,79 – 1,40) p <sub>3-4</sub> =0,043 p <sub>1-3</sub> =0,037	0,50 (0,40 – 0,75)
TNF-альфа	1,16 (0,90 – 2,37) p <sub>1-4</sub> =0,040	2,75 (0,98 – 4,30) p <sub>2-4</sub> =0,032 p <sub>2-3</sub> =0,021	6,70 (6,10 – 8,43) p <sub>3-4</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> =0,014	0,64 (0 – 0,83)
IFN-гамма	0	0,60 (0 – 0,87)	0	3,00 (0,50 – 5,40)
ИФ-1альфа *	0,051 (0,040 – 0,138)	0,078 (0,026 – 0,986)	0,050 (0,027 – 0,092)	0,080 (0,052 – 0,096)
Галектин-2	3,20 (2,07 – 4,00) p <sub>1-4</sub> <0,001 p <sub>1-2</sub> =0,010	11,00 (7,05 – 12,10)	3,85 (1,55 – 10,88) p <sub>3-4</sub> =0,047	13,50 (11,50 – 17,00)
Галектин-9	1,00 (0,40 – 2,46)	8,50 (3,96 – 15,00) p <sub>2-4</sub> =0,001 p <sub>2-3</sub> =0,020	0,50 (0 – 1,00)	0,16 (0 – 0,50)

1	2	3	4	5
M-CSF	0,40 (0,12 – 2,37) $p_{1-4}=0,003$ $p_{1-2}=0,020$	2,80 (2,66 – 3,86)	1,20 (1,06 – 4,49)	4,85 (3,60 – 7,76)

*Примечание: \*HIF-1альфа здесь в концентрации нг/мл, p – уровень статистической значимости межгрупповых различий показателей, где группа 1 – пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС), группа 2 – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), группа 3 – больные туберкулезом легких (ТЛ), группа 4 – здоровые доноры.*

Интересно отметить, что у больных ИБС и ТЛ сходный дисбаланс субпопуляций моноцитов крови сопровождался аналогичными изменениями спектра медиаторов крови (в сравнении со здоровой группой): отмечался дефицит интерферона (IFN) гамма и галектина-2 при нормальном уровне IL-6 и галектина-9. Между тем, у больных ХОБЛ, наоборот, нормальная концентрация IFN-гамма и галектина-2 сочеталась с высоким уровнем IL-6 и галектина-9 (таблица 4).

Группы больных ХОБЛ и ТЛ с дыхательной гипоксией объединяло высокое содержание IL-13 и нормальная концентрация колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) в крови в отличие от больных ИБС с циркуляторной гипоксией, у которых определялась нормальная концентрация IL-13 и дефицит M-CSF в крови (таблица 4).

### **3.4 Сравнение концентрации цитокинов, HIF-1альфа и галектинов в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца**

Содержание TNF-альфа, HIF-1альфа, галектина-9, галектина-2, IL-1бета, M-CSF в костном мозге у больных ИБС было больше, чем в крови. Концентрация IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-гамма в костном мозге не отличалась от таковой в кровотоке (таблица 5).

При этом содержание IL-6, IL-10, IL-13, галектина-2 и HIF-1альфа в костном мозге положительно коррелировало с их концентрацией в крови (соответственно  $r=0,77$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,87$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,98$ ,  $p<0,001$ ;  $r=0,58$ ,  $p<0,01$ ;

$r=0,41, p<0,05$ ).

Таблица 5 - Концентрация цитокинов, ИИФ-1альфа и галектинов в костном мозге в сравнении с их количеством в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца, (Ме (Q1 – Q3))

Медиаторы, пг/мл	Материал исследования	
	Кровь (n=40)	Костный мозг (n=40)
ИЛ-1бета	2,06 (0,35 – 2,74)	5,00 (2,80 – 24,56) p=0,044
ИЛ-4	0	0
ИЛ-6	2,10 (1,53 – 4,95)	6,50 (4,10 – 10,95)
ИЛ-10	24,00 (23,00 – 28,50)	26,70 (23,20 – 30,50)
ИЛ-13	0,60 (0,41 – 0,82)	0,45 (0,21 – 0,85)
ИФН-гамма	0	0
ТНФ-альфа	1,16 (0,90 – 2,37)	10,81 (9,90 – 22,04) p<0,001
ИИФ-1альфа*	0,051 (0,040 – 0,138)	0,840 (0,442 – 0,917) p=0,001
Галектин-2	3,21 (2,05 – 4,00)	9,00 (4,20 – 11,64) p=0,038
Галектин-9	1,00 (0,40 – 2,46)	4,62 (3,60 – 6,03) p=0,007
М-CSF	0,43 (0,12 – 2,37)	5,80 (2,54 – 16,79) p=0,041

Примечание: \*ИИФ-1альфа здесь в концентрации нг/мл, p – уровень статистической значимости различий показателей крови и костного мозга.

### 3.5 Корреляции между численностью субпопуляций моноцитов и концентрацией иммунорегуляторных медиаторов в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца

В костном мозге у больных ИБС обнаружались корреляции между концентрацией цитокинов (IL-10, IL-13, M-CSF) и содержанием классических CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, промежуточных CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> и переходных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов (таблица 6).

Таблица 6 – Корреляции между численностью субпопуляций моноцитов и концентрацией цитокинов и HIF-1альфа в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца

Костный мозг		Кровь	
Цитокины	Субпопуляции моноцитов	Цитокины	Субпопуляции моноцитов
1	2	3	4
IL-10	Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> r=0,65 p<0,05	IL-10	Неклассические CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> r=-0,85 p<0,05
			Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> r=0,86 p<0,05
IL-13	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> r=0,70 p<0,05	HIF-1альфа	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> r=0,84 p<0,01
	Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> r=-0,63 p<0,05		

1	2	3	4
M-CSF	Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> r=0,62 p<0,05	M-CSF	Классические CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> r=0,81 p<0,05
	Переходные CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup> r=-0,62 p<0,05		Промежуточные CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> r=-0,80 p<0,05

*Примечание: r – коэффициент корреляции, p – уровень статистической значимости.*

В крови у больных ИБС обнаруживалась иная картина корреляций между содержанием цитокинов IL-10, M-CSF и HIF-1альфа и субпопуляций моноцитов (таблица 6). У пациентов с ХОБЛ и у больных ТЛ обнаруживалась негативная корреляция доли классических моноцитов с уровнем HIF-1альфа ( $r=-0,82$ ;  $p<0,05$  и  $r=-0,83$ ;  $p<0,05$  соответственно) и с концентрацией галектина-9 ( $r=-0,89$ ;  $p<0,05$  и  $r=-0,87$ ;  $p<0,05$  соответственно) в крови, а также положительная взаимосвязь числа промежуточных форм моноцитов с уровнем HIF-1альфа ( $r=0,79$ ;  $p<0,05$  и  $r=0,78$ ;  $p<0,05$  соответственно) и с концентрацией галектина-9 ( $r=0,88$ ;  $p<0,05$  и  $r=0,78$ ;  $p<0,05$  соответственно) в крови. При этом у больных ТЛ в крови выявлялась положительная корреляция уровня TNF-альфа с долей классических моноцитов ( $r=0,76$ ;  $p<0,05$ ) и концентрации IL-13 с количеством промежуточных клеток ( $r=0,77$ ;  $p<0,05$ ).

Важно отметить, что у здоровых доноров в крови регистрировалась отрицательная зависимость содержания промежуточных моноцитов от концентрации галектина-2 ( $r=-0,94$ ;  $p<0,01$ ) и положительная от концентрации IL-10 ( $r=0,87$ ;  $p<0,05$ ), что может оказаться важным для понимания механизмов поддержания баланса субпопуляций моноцитов крови в норме и патогенеза его нарушений при дыхательной и циркуляторной гипоксии.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что различные заболевания инфекционного и неинфекционного генеза приводят к активации моноцитарно-макрофагальной системы [20, 35].

При определении субпопуляций моноцитов в крови у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) отмечалось увеличение численности  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических моноцитов на фоне дефицита остальных субпопуляций клеток (таблица 1). Данную реакцию моноцитарно-макрофагальной системы можно объяснить патогенезом заболевания и функциональной ролью классических моноцитов. Считается, что ХОБЛ развивается, когда вдыхаемые раздражители (табачный дым, либо частицы воздуха, которые являются главным этиологическим фактором при ХОБЛ) повреждают эпителиальные клетки. Важную (предрасполагающую к ХОБЛ) роль при этом играют также недостаточность альфа1-атитрипсина (подавляет активность нейтрофильной эластазы и деградацию белка соединительной ткани – эластина – в стенках альвеол), гиперреактивность дыхательных путей и синдром «малых легких» (при недоношенности в анамнезе), иммунный дисбаланс вследствие частых простудных заболеваний [8, 10, 11]. Альтерация эпителия дыхательных путей приводит к воспалению, активирует иммунную систему непосредственно через рецепторы к молекулам повреждения на иммуноцитах, либо косвенно, вызывая высвобождение цитокинов и хемокинов поврежденными эпителиальными и эндотелиальными клетками [127]. Параллельно повышается адгезивность стенки сосудов, она становится проницаемой для нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, эмигрирующих из крови в легкие [72].

Поскольку основной функцией  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических моноцитов является фагоцитоз [100], то увеличение их количества при этом заболевании вполне закономерно и отражает состоятельность моноцитопоза у больных ХОБЛ. Кроме того, у пациентов с ХОБЛ обнаруживается увеличение секреции цитокинов и хемокинов, в частности, повышение уровня фактора некроза опухоли (TNF) альфа, интерлейкина (IL)-1бета, IL-12, хемокинов CCL2, CCL3, CCL5 в

крови [72], которые являются характерными продуктами секреции классической субпопуляции моноцитов и M1-макрофагов, в которые они дифференцируются.

Отмечается увеличение численности неклассической субпопуляции циркулирующих моноцитов у пациентов с тяжелой формой ХОБЛ [48].

Как было описано ранее, промежуточные моноциты являются провоспалительными клетками и активно синтезируют TNF-альфа и IL-1бета [154]. У пациентов с туберкулезом легких (ТЛ) и ишемической болезнью сердца (ИБС) обнаруживался избыток  $CD14^{++}CD16^{+}$  промежуточных моноцитов на фоне дефицита  $CD14^{+}CD16^{-}$  переходных клеток. Одинаковая картина характера дифференциации моноцитов при такого рода разных по этиологии (инфекционная и неинфекционная) и локализации заболеваний объясняется параллельным развитием двух типовых патологических процессов: воспаления и гипоксии [40]. В то же время, воспаление и гипоксия развиваются и при ХОБЛ, но картина соотношения субпопуляций моноцитов в крови у этих больных совсем иная. Очевидно, для определения направления созревания моноцитов более важным оказывается антигенная (макромолекулярная) природа флогогена вне зависимости от его происхождения – инфекционного или неинфекционного.

Согласно современным представлениям, разные типы иммунокомпетентных клеток активируются посредством молекул трех типов: 1) *образов патогенности, или патоген-ассоциированных молекулярных паттернов* (PAMP – pathogen-associated molecular pattern) инфекционных возбудителей вирусной или бактериальной природы, простейших, паразитов и грибов, которые связываются паттерн-распознающими рецепторами (PRR – pattern-recognition receptor) на клетках врожденного иммунитета (в частности клетках СМФ); 2) *антигенов* – высокомолекулярных соединений (белков или липополисахаридов), распознаваемых с помощью антиген-специфических рецепторов (TCR – T-cell receptor и BCR – B-cell receptor) соответственно на Т- и В-лимфоцитах; 3) стрессорных молекул – эндогенных молекул организма, экспрессируемых на мембране клеток при опасности повреждения, и образов опасности (DAMP – danger-associated molecular pattern) – родственной им группы молекул,



сигнализирующих о повреждении. Последние также могут распознаваться клетками врожденного иммунитета, некоторые из них – рецепторами для PAMP [25, 46].

При туберкулезной инфекции в организм попадают и размножаются *Mycobacterium tuberculosis* (микобактерии туберкулеза – МБТ), имеющие антигенные детерминанты и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP). Последние распознаются scavenger-рецепторами иммунокомпетентных клеток СМФ [25, 41]. При атеросклерозе коронарных артерий эти же клетки реагируют на видоизмененные липопротеины низкой плотности, которые приобретают свойства аутоантигенов в результате их пероксидации и гликозилирования [28]. Они, также как и PAMP микроорганизмов, распознаются scavenger-рецепторами моноцитов/макрофагов и дендритных клеток [25, 41], активируя синтез провоспалительных цитокинов при ИБС [38]. Вероятно, из-за того, что CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> промежуточные моноциты обеспечивают иммунное взаимодействие с Т-лимфоцитами [132], и повышается их численность у больных ИБС и пациентов с ТЛ (таблица 1).

Современные исследования, посвященные моноцитам и их субпопуляциям при туберкулезе, показали, что численность CD16<sup>+</sup> моноцитов увеличивается при туберкулезной инфекции. Активация этого типа клеток определяет тяжесть течения туберкулеза [142]. Пациенты с положительной подкожной туберкулиновой пробой имеют более высокое количество CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов, чем доноры с отрицательной пробой Манту [151].

Отрицательная корреляция между количеством CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> классических и CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> промежуточных клеток у больных с ТЛ и ИБС (таблица 2) подтверждает мнение о том, что созревание моноцитов происходит последовательно: классические моноциты дифференцируются в промежуточные, а затем в неклассические клетки [176]. Аналогичная связь обнаруживается и у больных ХОБЛ (таблица 2), а снижение численности промежуточных и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> неклассических моноцитов (таблица 1), вероятно, является результатом блокады созревания классических клеток в другие субтипы

моноцитов. Отличие в характере дифференциации моноцитов при ХОБЛ, вероятно, связано с неорганическим происхождением частиц (например, дыма, строительной пыли), стимулирующих макрофаги, что влечет экспрессию молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP), в клетках [36] и, очевидно, другой характер активации клеток моноцитарно-макрофагальной системы.

У пациентов во всех группах исследования корреляций между числом  $CD14^+CD16^{++}$  неклассических и  $CD14^{++}CD16^+$  промежуточных моноцитов в крови обнаружено не было. Данный факт отрицает последовательную дифференциацию клеток неклассической субпопуляции из промежуточных моноцитов [176], по крайней мере, непосредственно в крови. Однако имеющаяся у здоровых доноров отрицательная зависимость между количеством  $CD14^+CD16^{++}$  неклассических и  $CD14^+CD16^-$  переходных моноцитов в крови (таблица 2) свидетельствует о том, что неклассические моноциты созревают, скорее, из переходных клеток, и, вероятно, это происходит только в организме здорового человека.

Возможно,  $CD14^+CD16^-$  переходные клетки являются предшественниками других форм моноцитов. В доказательство этому у больных ИБС мы обнаружили многократное увеличение числа данной субпопуляции клеток на фоне снижения содержания классических и промежуточных форм в костном мозге по сравнению с их количеством в крови (рисунок 1, таблица 3). Это подтверждается негативной связью переходных моноцитов с числом классических и промежуточных форм клеток в костном мозге (рисунок 2, таблица 2). Отсутствие связей между численностью неклассических и других субпопуляций моноцитов в костном мозге позволяет думать об экстрамедуллярной дифференциации этих клеток.

Исходя из полученных данных, можно отвергнуть предположение об окончательной дифференциации моноцитов на четыре субпопуляции только в костном мозге. Возможно, классические, промежуточные, неклассические и переходные моноциты не являются самостоятельными миелоидными линиями, так как распределение по четырем субпопуляциям обнаруживается только в крови. В костном мозге мы обнаружили в наибольшем количестве переходные

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клетки (таблица 3, рисунок 1), из которых затем, вероятно, дифференцируются другие субпопуляции моноцитов (рисунок 2).

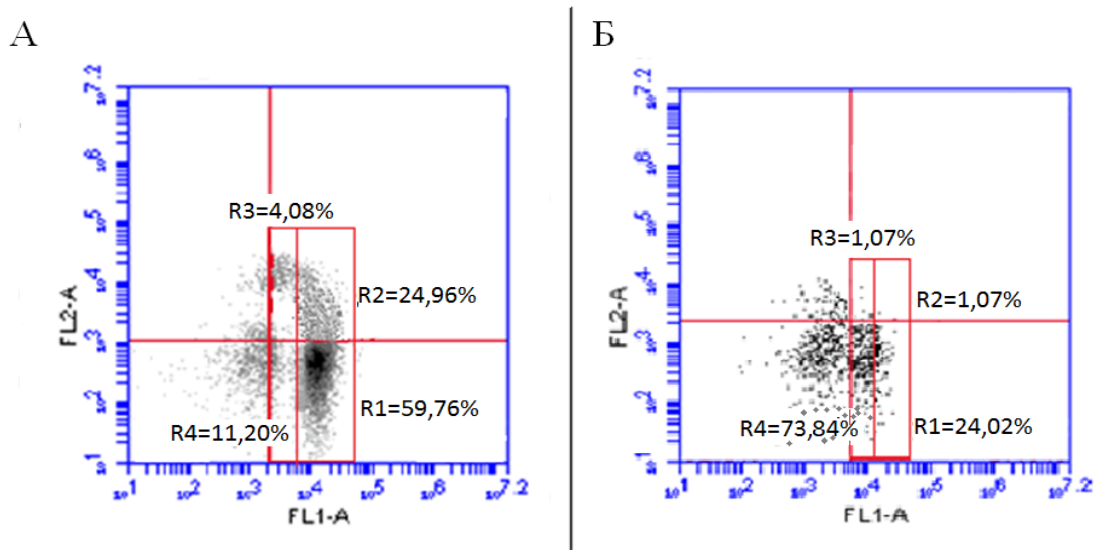


Рисунок 1 - Сравнительный анализ субпопуляций моноцитов в крови (А) и в костном мозге (Б) у больного И., 58 лет с ишемической болезнью сердца.

Примечание: R1 – относительное (%) содержание классических моноцитов (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), R2 – промежуточных моноцитов (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), R3 – неклассических моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), R4 – переходных моноцитов (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>).

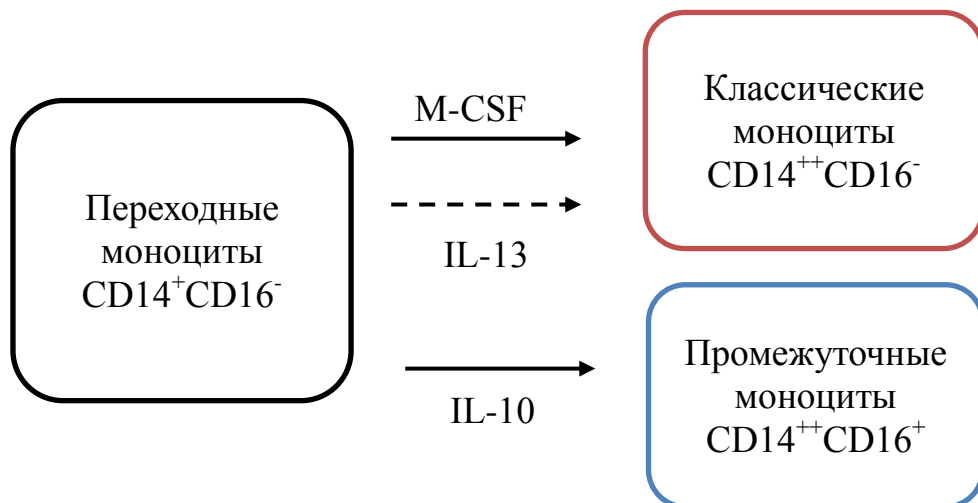


Рисунок 2 - Участие цитокинов в дифференциации субпопуляций моноцитов в костном мозге при ишемической болезни легких.

Примечание: пунктирная стрелка – отрицательное (ингибирующее) влияние, сплошные стрелки – положительное (активирующее) влияние; здесь и далее в рисунках 3 и 4: IL – интерлейкин, M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов

С другой стороны, можно думать, что из переходных  $CD14^+CD16^-$  моноцитов в костном мозге образуются классические  $CD14^{++}CD16^-$  клетки, так как они имеют наибольшую из трех других субпопуляций численность в миелоидной ткани. При этом впоследствии возможны два варианта:

1) промежуточные и неклассические моноциты дифференцируются независимо друг от друга из классических моноцитов в крови или в периферических тканях (так как моноциты – рециркулирующие клетки крови).

2) из классической субпопуляции моноцитов сначала в крови (или в тканях) дифференцируются промежуточные клетки, затем из промежуточных клеток – неклассические моноциты.

В исследованиях зарубежных ученых было замечено, что M-CSF в плазме крови способствует дифференциации классических  $CD14^{++}CD16^-$  моноцитов в промежуточные  $CD14^{++}CD16^+$  клетки, а затем из промежуточных – в неклассические  $CD14^+CD16^{++}$  моноциты, и этот процесс может быть ингибирован нейтрализующими моноклональными антителами против M-CSF [75]. Возможность дифференциации классических моноцитов в промежуточные клетки обосновывается результатами исследования, в котором часть активированных  $CD14^{++}CD16^-$  моноцитов изменяла свой фенотип на  $CD14^{++}CD16^+$ , и к тому же приобретала провоспалительные свойства, как у промежуточной субпопуляции моноцитов [154].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что дифференциация  $CD14^{++}CD16^+$  моноцитов возможна из  $CD14^{++}CD16^-$  клеток [171]. Культивирование выделенных из периферической крови  $CD14^{++}CD16^-$  моноцитов в присутствии IL-4, IL-10 и GM-CSF приводит к появлению на их поверхности рецептора CD16 и снижению экспрессии CD14. В итоге моноциты приобретают другой фенотип –  $CD14^{++}CD16^+$  [57, 141].

Известно, что данные цитокины определяют альтернативный путь активации моноцитов/макрофагов, при котором клетки начинают продуцировать преимущественно цитокины с противовоспалительной/иммуносупрессорной активностью [178, 197]. Полученные сведения доказывают возможность

последовательной дифференциации моноцитов из одной субпопуляции в другую. Данные, подтверждающие наличие четырех самостоятельных миелоидных линий моноцитопоэза в костном мозге, в доступной литературе отсутствуют.

При исследовании цитокинового профиля крови во всех группах больных наблюдали избыток TNF-альфа и дефицит IL-4 (таблица 4). Эти показатели отражают системную воспалительную реакцию [38], типичную для всех рассматриваемых заболеваний, и гипоксии в том числе, и отличающейся преобладанием провоспалительных цитокинов над противовоспалительными (в данном случае TNF-альфа над IL-4).

TNF-альфа играет важную роль в защите от вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, а также в аутоиммунных реакциях. Естественная индукция TNF является защитной, но его избыток может оказывать повреждающий эффект [192].

Макрофаги, моноциты и эндотелиальные клетки являются основным источником TNF-альфа. Он выступает в роли ключевого медиатора процессов воспаления и иммунного ответа, опосредует цитотоксичность, противовирусную активность и стимуляцию роста клеток. Взаимодействуя с интерфероном (IFN) гамма, TNF-альфа активирует макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, регулирует апоптоз Т-лимфоцитов [192]. TNF-альфа усиливает образование активных форм кислорода и азота, гистамина, простагландинов и лейкотриенов; увеличивает экспрессию NF-κB и способствует привлечению, миграции и удержанию воспалительных клеток в месте инфекции и воспаления, оказывая влияние на адгезивные свойства лейкоцитов и их взаимодействие с эндотелием [168]. Некоторые исследования показывают, что TNF-альфа является кардиотоксичным для здорового миокарда и потенциально кардиопротективным для миокарда с нарушением функций. Кардиотоксичность в первую очередь обусловлена индуцированным TNF-альфа апоптозом кардиомиоцитов, в то время как кардиозащита является результатом индуцированной TNF-альфа эктопической экспрессии кератина в кардиомиоцитах. Кроме того, увеличение секреции TNF-альфа стимулирует синтез провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8),

которые совместно со свободными радикалами кислорода, выделяемыми нейтрофилами и макрофагами, инициируют повреждение стенки сосудов при заболеваниях сердца. Помимо своей роли в развитии заболеваний миокарда, TNF-альфа участвует в патогенезе атеросклероза, воздействуя на липидный обмен, активируя эндотелиальные клетки и вызывая воспаление в сосудистой стенке [121].

IL-4 представляет собой противовоспалительный цитокин, который функционирует в качестве мощного регулятора иммунитета, секретируемого главным образом Th2-клетками, эозинофилами и базофилами. Он играет важную роль в выживании лейкоцитов как при физиологических, так и при патологических состояниях, регулирует восстановление тканей и тканевой гомеостаз через активацию M2-макрофагов. IL-4 блокирует спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-8, TNF-альфа моноцитами и макрофагами. Многие иммуномодулирующие эффекты IL-4 опосредованы его влиянием на продукцию других цитокинов [25].

Появление атерогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на стенках сосудов и дислипидемия являются пусковыми факторами активации иммунных клеток, участвующих в «патрулировании» эндотелия. Они запускают секрецию провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию воспаления и прогрессирующему повреждению стенки сосудов. Кроме того, большое количество привлеченных активированных макрофагов и Т-лимфоцитов, повышенная продукция свободных радикалов кислорода, медиаторов и аутоантигены поддерживают этот воспалительный процесс. В этой связи мы полагаем, что обнаруженное нами увеличение концентрации провоспалительного TNF-альфа на фоне дефицита противовоспалительного IL-4 в крови у больных ИБС (таблица 4) усиливает процессы альтерации и воспаления в стенке сосудов. Вероятно, именно нарушение баланса между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами определяет дальнейшее течение и усугубление повреждающих процессов.

Обнаруженные в настоящем исследовании нормальные величины

содержания HIF-1альфа в крови (таблица 4) на фоне гипоксии, присутствие которой при ИБС, ХОБЛ и ТЛ не вызывает сомнений, можно объяснить наличием хронической, а не острой гипоксии. Первоначально клетки находятся в состоянии выраженной гипоксии и активируются сразу оба фактора – HIF-1альфа и HIF-2альфа, при этом основным из них является HIF-1альфа. В эндотелии, подверженном гипоксическому стрессу, HIF-1альфа регулирует первичную (острую) адаптацию к гипоксии: быстрое переключение метаболизма на анаэробный гликолиз, защиту от апоптоза, продукцию ростовых факторов и формирование примитивной сосудистой сети. Экспрессия HIF-2альфа начинается, когда гипоксия приобретает хронический характер, и опосредует созревание и стабилизацию ранее сформированной примитивной сосудистой сети [122]. Согласно данным литературы, главным транскрипционным регулятором активации иммунных клеток при гипоксии является HIF-1альфа, именно он обеспечивает индуцибельную секрецию провоспалительных медиаторов. Гипоксия и ассоциированный с дефицитом кислорода ацидоз активируют тканевые протеолитические системы организма. Учитывая, что анаэробный тип метаболизма характерен для M1-макрофагов, нейтрофилов, Th1-, Th2-, Th17-, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [178], можно предположить, что именно они являются источником ассоциированной с гипоксией цитокинемии и (вследствие дегрануляции клеток врожденного иммунитета) ферментемии при развитии иммуновоспалительных реакций.

С другой стороны, HIF-1альфа-зависимое образование сосудистой сети приводит к увеличению перфузии и, следовательно, к увеличению концентрации кислорода, что может быть стимулом к продукции и накоплению HIF-2альфа, который менее подвержен кислород-зависимой дестабилизации. Следовательно, во время длительной гипоксии в эндотелии происходит переключение синтеза с HIF-1альфа на HIF-2альфа [122]. В отличие от срочной адаптации формирование долгосрочной адаптации в ответ на гипоксию протекает на фоне увеличения продукции NO, провоспалительных и противовоспалительных факторов, экспрессии VEGF, уменьшения окислительной модификации липопротеинов и

увеличения резистентности биологических мембран. На протяжении этого периода уровень HIF-1альфа сначала остается повышенным, однако постепенно он начинает уменьшаться, что может указывать на завершение адаптации [7, 31].

Вследствие активации секреции цитокинов, гипоксия может потенцировать хроническое воспаление. Гипоксические воздействия способствуют активации продукции IL-6, IL-1бета, TNF-альфа, а также противовоспалительного IL-10 (рисунок 3) [92]. При острой гипоксии провоспалительные цитокины и факторы роста действуют как мощные регуляторы стабилизации и активации HIF-1альфа [92]. Цитокины также могут активировать кислород-независимые сигнальные пути синтеза HIF-1альфа (например, MAPK) и участвовать в срочных и устойчивых механизмах адаптации к гипоксии [92].

Таким образом, адаптация к гипоксии реализуется не только на уровне медиаторных реакций, но и на уровне клеток и межклеточных взаимодействий. Следует отметить, что концентрация HIF-1альфа у больных ИБС положительно коррелировала с численностью переходных моноцитов в крови (таблица 6), а у пациентов с ХОБЛ и ТЛ обнаруживалась негативная корреляция его концентрации с долей классических и положительная – с долей промежуточных моноцитов в крови, что демонстрирует неоднозначность эффектов данного фактора на дифференциацию субпопуляций моноцитов в зависимости от типа гипоксии. Вероятно, эффект HIF-1альфа зависит от концентрации других цитокинов: при циркуляторной гипоксии нормальная секреция HIF-1альфа сочетается с недостатком M-CSF, что у больных ИБС стимулирует созревание классических клеток из переходных моноцитов в костном мозге (таблица 6) и облегчает элиминацию переходных форм клеток из костного мозга в кровь; при дыхательной гипоксии нормальная секреция HIF-1альфа ассоциирована с избытком IL-13, что у больных ТЛ способствует созреванию классических моноцитов в промежуточные клетки (см. раздел 3.5) и способствует накоплению промежуточных моноцитов в крови.





Рисунок 3 - Медиаторы перераспределения субпопуляций моноцитов в крови у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), туберкулезом легких и с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ).

Примечание: PAMP – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн, ЛПНП – липопротеины низкой плотности; здесь и далее в рисунке 4: IFN – интерферон, TNF – фактор некроза опухоли, HIF – гипоксией индуцируемый фактор

Сравнивая цитокиновый спектр плазмы крови у больных ИБС и пациентов с ТЛ с содержанием субпопуляций моноцитов в крови, и сопоставляя его с аналогичными показателями у больных ХОБЛ, мы выявили два типа ассоциаций: 1) недостаточности IFN-гамма и галектина-2 с увеличением числа (активацией дифференциации) промежуточных моноцитов и 2) профицита IL-6 и галектина-9 с повышением доли (дифференциацией) классических моноцитов (таблица 4).

IFN-гамма вырабатывается активированными Т-лимфоцитами, макрофагами или дендритными клетками и является мощным индуктором макрофагов и Th1-иммунного ответа, продукции воспалительных цитокинов [137]. IFN-гамма может усиливать или подавлять аутоиммунные реакции и связанную с ними альтерацию [119].

IL-6 представляет собой провоспалительный цитокин, который играет центральную роль в иммунных и гемопоэтических процессах, обладает способностью инициировать развитие реакций острой фазы. При инфекционном поражении запускается каскад реакций с участием PAMP, которые распознаются моноцитами и макрофагами. Активируется ряд сигнальных путей, включая NF-κB, и усиливается синтез провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF-альфа и IL-1бета. Повышение концентрации IL-6 в циркуляции сигнализирует о повреждении тканей и органов. Связанные с повреждением молекулы типа DAMP высвобождаются из поврежденных или умирающих клеток при воспалении – как асептическом, так и инфекционном. Высвобождение DAMP из клеток при повреждении способствует повышению концентрации IL-6 и белков острой фазы в крови, отражает активность вторичной альтерации при воспалении (рисунок 3) [175].

Особенности цитокинового фона у пациентов с заболеваниями бронхолегочной системы в отличие от больных ИБС могут быть обусловлены как локализацией патологического процесса, так и характером гипоксии: возможно избыток IL-13 в крови отражает альтерацию легочной ткани и бронхов или же дыхательную гипоксию, а дефицит M-CSF – поражение миокарда и сосудов или

же циркуляторную гипоксию (таблица 4, рисунок 3). Последняя отличается от дыхательной гипоксии отсутствием гипоксемии, то есть иммунокомпетентные клетки крови у больных ИБС находятся в условиях нормоксии и продуцируют, очевидно, физиологические концентрации IL-13, при этом макрофаги и стромальные клетки-предшественницы в тканях испытывают дефицит кислорода и синтезируют M-CSF меньше, чем в норме [46]. У больных с патологией бронхолегочной системы альвеолярные макрофаги и стромальные клетки данной локализации активированы объектами фагоцитоза как инфекционного (ТЛ), так и неинфекционного (ХОБЛ) происхождения и секретируют, очевидно, много M-CSF, что компенсирует недостаточную его продукцию при гипоксии тканевыми макрофагами другой локализации. При этом клетки крови при дыхательной гипоксии испытывают кислородное голодание и, вероятно, реагируют на гипоксемию усиленным образованием IL-13.

IL-13 является мощным индуктором макрофагального, эозинофильного и лимфоцитарного ответа, участвует в развитии фиброза дыхательных путей. Было продемонстрировано, что другие цитокины, такие как IL-9, модулируют свои эффекты в легких через способность индуцировать секрецию и эффекты IL-13. Активированные Th2-лимфоциты секретируют цитокины (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13), которые стимулируют воспаление, вызывая повреждение тканей в связи с гиперреактивностью дыхательных путей [43].

Модифицированные ЛПНП активируют эндотелиальные клетки, вызывая экспрессию ими молекул клеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и секрецию хемотаксических протеинов MCP-1, MIP-1, которые привлекают моноциты из просвета сосуда в субэндотелиальное пространство и способствуют ускорению дифференциации моноцитов в макрофаги и привлечению их в зону атерогенного воспаления. M-CSF стимулирует дифференциацию моноцитов в макрофаги и повышает экспрессию на них ScR-A, которые опосредуют проникновение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в интиму артерий. У мышей-нокаут по M-CSF атеросклероз значительно менее выражен, чем у таких же M-CSF-ненокаутированных мышей [44].

Положительная корреляция содержания IL-6, IL-10, IL-13, галектина-2 и HIF-1альфа в костном мозге с их концентрацией в крови подтверждает, что эти медиаторы являются факторами дистантной регуляции гемопоэза (таблица 6, рисунок 4).

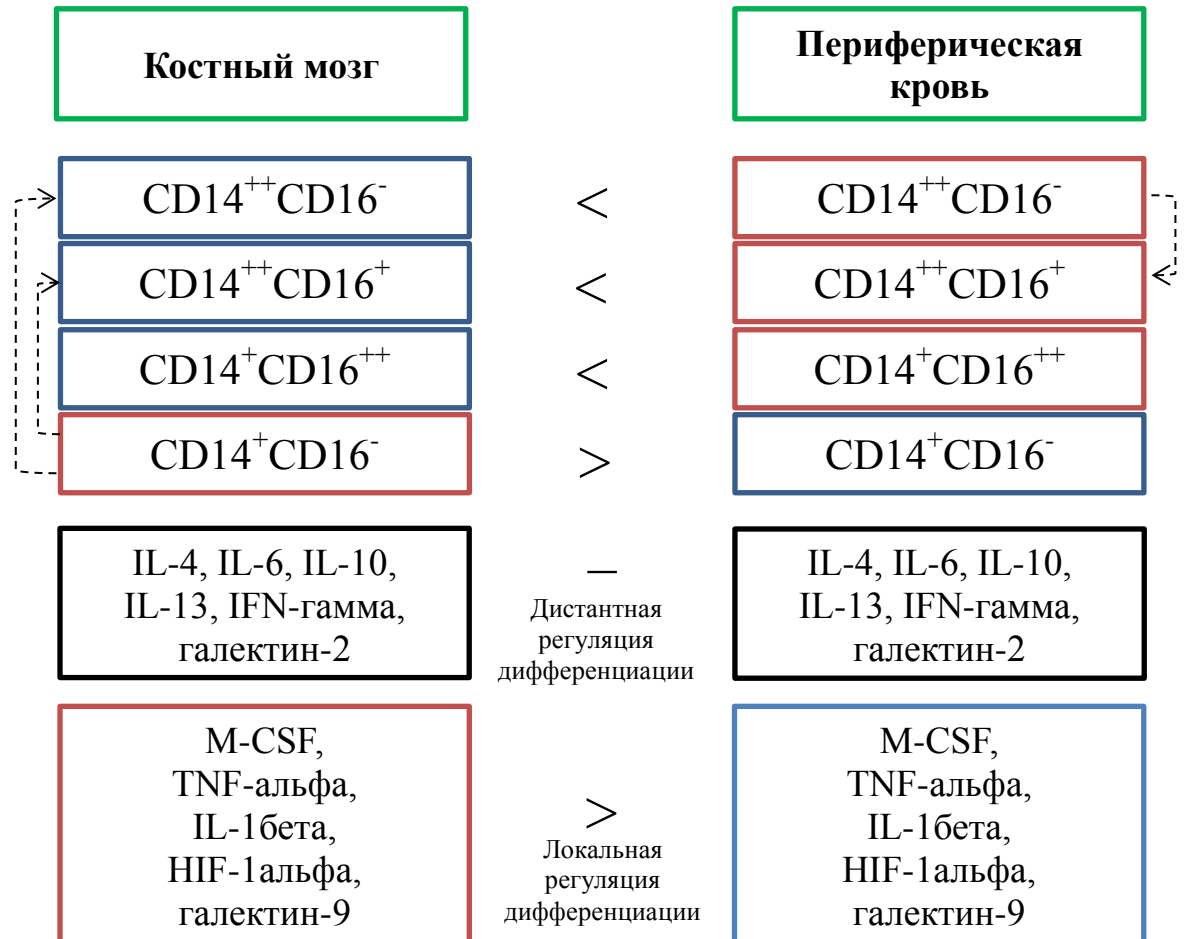


Рисунок 4 - Сравнительная характеристика состава субпопуляций моноцитов и медиаторов их распределения в крови и костном мозге у больных с ишемической болезнью сердца.

*Примечание.* Пунктирные стрелки – отрицательные корреляции, < – концентрация медиатора меньше, > – концентрация медиатора больше, = – сопоставимая концентрация медиатора.

Галектин-9, M-CSF и TNF-альфа представляют собой факторы локальной регуляции кроветворения, поскольку их концентрация в костном мозге и крови не взаимосвязана. HIF-1альфа скорее также принадлежит к локальным факторам, поскольку, несмотря на взаимосвязь его гемической и интрамедуллярной

концентраций, последняя в 16 раз превосходила содержание медиатора в крови (таблица 3), в связи с чем думается, что экстрamedулярный уровень ИИФ-1 альфа не оказывает существенного влияния на кроветворение.

Исходя из данных корреляционного анализа цитокинового спектра и субпопуляционного состава моноцитов в крови у больных ИБС (таблица 6), можно сделать вывод о том, что М-CSF препятствует внекостномозговой дифференциации  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических моноцитов в  $CD14^{++}CD16^{+}$  промежуточные клетки, ИЛ-10 тормозит созревание  $CD14^{+}CD16^{++}$  неклассических моноцитов, а ИИФ-1 альфа, очевидно, либо угнетает дифференциацию  $CD14^{+}CD16^{-}$  переходных моноцитов в другие их формы в крови, либо облегчает элиминацию этих клеток из костного мозга в кровотоки, что можно рассматривать как ответную реакцию костномозговых синусов на гипоксию. Поскольку у больных ИБС содержание М-CSF в крови не достигало нормы (таблица 4), то это, вероятно, растормаживало дифференциацию классических моноцитов в промежуточные клетки с формированием их профицита в крови при недостатке переходных форм.

Влияние цитокинов на субпопуляционный состав моноцитов крови у здоровых доноров характеризовалось положительной зависимостью количества промежуточных моноцитов от концентрации ИЛ-10 и отрицательной – от галектина-2 в крови (таблица 6, рисунок 3). По всей видимости, физиологические концентрации этих молекул с противоположным эффектом на экстрamedулярную дифференциацию моноцитов обеспечивают в норме равновесие данного процесса. У больных ХОБЛ и пациентов с ТЛ концентрация ИЛ-10 в крови соответствовала норме, но у больных ТЛ (как и у пациентов с ИБС) содержание галектина-2 было пониженным, что могло быть фактором растормаживания экстрamedулярной дифференциации классических моноцитов в промежуточные клетки при ТЛ (как и при ИБС), однако содержание субпопуляции  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических клеток в крови не снижалось (таблица 1) и положительно зависело от возросшего на фоне туберкулеза уровня TNF-альфа в крови (таблица 4).

Промежуточные моноциты обладают провоспалительными свойствами [19,

173], что доказывает провоспалительный эффект острой гипоксии. Между тем, у пациентов с ТЛ это сопровождалось, действительно, увеличением численности промежуточных форм моноцитов, а у больных ХОБЛ – ростом субпопуляции классических клеток. Возможно, причина отличий субпопуляционного состава моноцитов крови при этих заболеваниях кроется в особенностях дисбаланса цитокинов, которые, как известно, в различных комбинациях ввиду плейотропности могут оказывать разнообразные, даже противоположные эффекты [25]. Цитокины в легких в основном продуцируют макрофаги и Т-клетки. При ХОБЛ макрофаги и нейтрофилы продуцируют провоспалительные медиаторы, такие как TNF-альфа, IL-1, IL-6 и IL-8 [191]. В соответствии с Th1-иммунным ответом повышенное содержание TNF-альфа в крови при ХОБЛ (таблица 4) характеризуют процесс воспаления.

Наряду с этим, у больных ХОБЛ отсутствовал дефицит галектина-2 и IFN-гамма, характерный для группы пациентов с ТЛ (таблица 4). По-видимому, физиологические концентрации этих молекул при ХОБЛ и тормозное влияние галектина-2 на дифференциацию моноцитов (установленное у здоровых доноров) в сочетании с избытком IL-6 препятствовали стимулирующему эффекту HIF-1альфа и галектина-9 на дифференциацию промежуточных клеток из классических моноцитов, в связи с чем содержание последних в крови возрастало.

У больных ТЛ помимо аналогичных корреляций уровня HIF-1альфа и галектина-9 с субпопуляционным составом моноцитов крови устанавливалась положительная зависимость между концентрацией IL-13 и численностью CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> промежуточных моноцитов в крови. Она сочеталась с многократным избытком TNF-альфа (таблица 4) и могла потенцировать эффекты HIF-1альфа и галектина-9 на эти клетки, что и приводило к нарастанию их числа в крови.

Следовательно, при дыхательной гипоксии HIF-1альфа, галектин-9 и IL-13, по всей видимости, оказывают модулирующее влияние на экстрамедуллярную дифференциацию промежуточных моноцитов из классических клеток, результат которого определяется содержанием галектина-2, IL-6 и TNF-альфа в крови.

Таким образом, изменение субпопуляционного состава моноцитов и цитокинового спектра крови при ИБС и ТЛ отражает типовую реакцию иммунной системы на ее антигенную стимуляцию вне зависимости от вида гипоксии и природы стимулирующего клетки фактора (аутоантиген или патоген). Дифференциация CD-фенотипа моноцитов контролируется цитокинами и галектинами и происходит не только в костном мозге, но и продолжается в кровотоке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие воспаления и генерализованной гипоксии у больных ИБС, ХОБЛ и туберкулезом легких индуцирует разные формы ответа моноцитарно-макрофагальной системы в зависимости от природы стимула – антигенная (в ответ на инфекционный возбудитель при туберкулезе и на аутоантигены окисленных ЛПНП при ИБС) или в ответ на повреждение факторами неантигенной низкомолекулярной природы (как в случае ХОБЛ). Так, изменение субпопуляционного состава моноцитов и медиаторного спектра крови при ишемической болезни сердца (ИБС) и туберкулезе легких отражает типовую реакцию иммунной системы на ее антигенную стимуляцию, которая проявляется ускорением генерации моноцитов из  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических клеток в  $CD14^{++}CD16^{+}$  промежуточные формы на фоне снижения численности  $CD14^{+}CD16^{-}$  переходных клеток и происходит вне зависимости от вида гипоксии. Данный механизм связан с PAMP-опосредованной и антигенной стимуляцией иммунной системы, что характерно для патологии как инфекционного, так и неинфекционного генеза и как при дыхательной, так и при циркуляторной гипоксии. При этом действие внешних факторов неантигенной природы (при ХОБЛ), несмотря на наличие дыхательной гипоксии, вызывает увеличение численности  $CD14^{++}CD16^{-}$  классических клеток в сочетании с недостаточностью остальных субпопуляций моноцитов в крови.

Дифференциация моноцитов на субпопуляции контролируется цитокинами и галектинами и происходит не только в костном мозге, но и продолжается в кровотоке. В костном мозге образуются  $CD14^{+}CD16^{-}$  переходные моноциты и начинается их независимая дифференциация в  $CD14^{++}CD16^{-}$  классические и  $CD14^{++}CD16^{+}$  промежуточные моноциты, которая в кровотоке трансформируется в последовательное созревание промежуточных моноцитов из классических клеток. В подтверждение этому у больных ИБС в костном мозге концентрация IL-10 положительно коррелировала с количеством промежуточных, IL-13 – переходных, M-CSF – классических моноцитов, а отрицательная связь выявлялась между содержанием IL-13 и классических клеток, а также M-CSF и переходных



моноцитов. Дифференциация  $CD14^+CD16^{++}$  неклассических моноцитов происходит, очевидно, экстрамедуллярно и, вероятно, в периферических тканях, поскольку взаимосвязи численности этой субпопуляции моноцитов с другими их субпопуляциями в крови обнаружено не было.

В общем, влияние генерализованной хронической гипоксии на дифференциацию моноцитов, согласно выявленным однонаправленным изменениям параметров крови у больных всех трех групп, проявляется уменьшением доли  $CD14^+CD16^-$  переходных моноцитов в крови, что ассоциировано с избытком TNF-альфа при соответствующей норме концентрации IL-1бета, IL-10 и HIF-1альфа в плазме крови.

## ВЫВОДЫ

1. В крови у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и туберкулезом легких, как и у здоровых доноров, преобладают классические  $CD14^{++}CD16^{-}$  клетки. У больных ХОБЛ увеличение количества классических моноцитов сопровождается снижением числа промежуточных  $CD14^{++}CD16^{+}$ , неклассических  $CD14^{+}CD16^{++}$  и переходных  $CD14^{+}CD16^{-}$  клеток. При ИБС и туберкулезе легких дефицит переходных моноцитов в крови сочетается с увеличением содержания промежуточных форм клеток.

2. При ИБС, неинфекционной (ХОБЛ) и инфекционной (туберкулез) патологии легких вне зависимости от вида сопровождающей их течение гипоксии (циркуляторная, дыхательная) обратная связь числа  $CD14^{++}CD16^{-}$  и  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноцитов в крови свидетельствует об экстремедуллярной дифференциации промежуточных клеток из классических моноцитов. Концентрация HIF-1альфа в крови при ИБС, ХОБЛ и туберкулезе легких соответствует норме.

3. Нарушения субпопуляционного состава моноцитов крови у больных ХОБЛ ассоциированы с повышением концентрации цитокинов IL-13, IL-6 и галектина-9, а у больных туберкулезом легких и ИБС – с дефицитом IFN-гамма и галектина-2. Дополнительным фактором дифференциации  $CD14^{++}CD16^{+}$  моноцитов у больных туберкулезом легких является повышение концентрации IL-13, а при ИБС – дефицит M-CSF в плазме крови.

4. Субпопуляционный состав моноцитов костного мозга и крови у больных ИБС различается: в костном мозге содержание переходных клеток выше, а классических, промежуточных и неклассических моноцитов – ниже, чем в крови. В костном мозге содержание  $CD14^{+}CD16^{-}$  клеток отрицательно коррелирует с числом промежуточных и классических моноцитов и зависит от концентрации M-CSF и IL-13.

5. При ИБС концентрация IL-6, IL-10, IL-13, галектина-2, IL-4 и IFN-гамма в костном мозге и плазме крови является сопоставимой и взаимосвязанной, что

указывает на их роль в дистантной регуляции субпопуляционного состава моноцитов костного мозга и крови. Концентрация M-CSF, TNF-альфа, IL-1бета, HIF-1альфа и галектина-9 в костном мозге многократно выше, чем в крови, что обосновывает их участие в локальной (интрамедуллярной) регуляции дифференциации CD-фенотипа моноцитов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АПК – антигенпрезентирующая клетка
- ДК – дендритные клетки
- ИБС – ишемическая болезнь легких
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КОЕ-ГМ – колониеобразующая единица гранулоцитов и макрофагов
- КОЕ-М – колониеобразующая единица макрофагов
- КШ – коронарное шунтирование
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности
- МБТ – микобактерия туберкулеза
- МКАТ – моноклональные антитела
- СМФ – система мононуклеарных фагоцитов
- ТЛ – туберкулез легких
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
- ЭПО – эритропоэтин
- BCR – B-cell receptor (В-клеточный рецептор)
- CD – cluster of differentiation (кластер дифференциации)
- CCL – C-C motif chemokine ligand (С-С лиганд хемокина)
- CRD – carbohydrate recognition domain (домен для распознавания углеводов)
- CXCR4 – C-X-C chemokine receptor type 4 (С-Х-С хемокиновый рецептор)
- DAMP – damage-associated molecular pattern (молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением)
- FSC – forward scatter (прямое светорассеяние)
- GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов)
- HIF – hypoxia-inducible factor (гипоксией индуцируемый фактор)
- ICAM – inter-cellular adhesion molecule (молекула клеточной адгезии)
- IFN – interferon (интерферон)
- IL – interleukin (интерлейкин)

iNOS – inducible nitric oxide synthase (индуцируемая NO-синтаза)

LPS – lipopolysaccharide (липополисахарид)

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

MCP – monocyte chemoattractant protein (хемоаттрактантный белок моноцитов)

M-CSF – macrophage colony-stimulating factor (колониестимулирующий фактор макрофагов)

MIP – macrophage inflammatory protein (воспалительный белок макрофагов)

MMR – macrophage mannose receptor (маннозный рецептор макрофагов)

MMP – matrix metalloproteinases (матриксные металлопротеиназы)

NF- $\kappa$ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор каппа)

NO – оксид азота

NK-клетки – natural killer cells (натуральные киллеры)

PAMP – pathogen-associated molecular pattern (патоген-ассоциированный молекулярный паттерн)

SSC – side scatter (боковое светорассеяние)

TCR – T-cell receptor (Т-клеточный рецептор)

TGF – transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)

Th – T-helper (Т-хелпер)

TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

VCAM – vascular cell adhesion molecule (васкулярная молекула клеточной адгезии)

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анаев, Э.Х. Биологические маркеры при хронической обструктивной болезни легких / Э.Х. Анаев // Практическая пульмонология. – 2018. – №1. – С. 26–32.
2. Анализы глазами реаниматолога / Ю.Ю. Сапичева, В.Л. Кассиль ; под ред. А.М. Овезова. – 4-е изд. – Москва : МЕДпресс-информ, 2018. – 224 с. : ил.
3. Белевский, А.С. Синдром перекреста бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких (по материалам совместного документа рабочих групп экспертов GINA и gold) / А.С. Белевский // Практическая пульмонология. – 2014. – №2. – С. 12–19.
4. Бердюгина, О.В. Функционально-метаболические особенности фагоцитов крови при разных формах туберкулезного воспалительного процесса легких / О.В. Бердюгина, А.В. Ершова // Медицинская иммунология. – 2016. – Т.18, № 1. – С. 21–32.
5. Билич, Г.Л. Атлас: анатомия и физиология человека : полное практическое пособие : все уровни и системы + 85 подробных иллюстраций / Г.Л. Билич, Е.Ю. Зигалова. – Москва : Эксмо, 2016. – 318 с.
6. Гемопоз и его регуляция на различных стадиях дифференцировки гемопозитических клеток костного мозга / Н.П. Чеснокова, В.В. Моррисон, Е.В. Понукалина, Т.Н. Жевак и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – Т.8, № 3. – С. 711–719.
7. Гипоксией индуцируемый фактор (HIF): структура, функции и генетический полиморфизм / А.Г. Жукова, А.С. Казицкая, Т.Г. Сазонтова, Н.Н. Михайлова // Гигиена и санитария. – 2019. – Т.98, № 7. – С. 723–728.
8. Дефицит альфа-1-антитрипсина у взрослых (проект федеральных рекомендаций) / А.С. Белевский, Н.А. Карчевская, М.М. Илькович, Т.Е. Гембицкая и др. // Практическая пульмонология. – 2017. – №3. – С. 98–108.
9. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных

- туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.В. Тихонова, С.Д. Никонов и др. // Сибирский научный медицинский журнал. – 2010. – Т.30, №2. – С. 101–108.
- 10.Замечник, Т.В. Гипоксия как пусковой фактор развития эндотелиальной дисфункции и воспаления сосудистой стенки / Т.В. Замечник, Л.Н. Рогова // ВНМТ. – 2012. – №2. – С. 393–394
- 11.Ищенко, О.В. Недостаточность системы иммунитета при хронической обструктивной болезни легких / О.В. Ищенко, А.В. Сукало // Иммунопатология, аллергология, инфектология иммунодефициты. – 2018. – №1. – С. 73–78.
12. Калягин, А.Н. Понятие о недостаточности функции внешнего дыхания. Спирография. Диагностика обструктивной и рестриктивной дыхательной недостаточности: Учебное пособие для студентов / А.Н. Калягин, Т.В. Аснер; под ред. Ю.А. Горяева. – Иркутск, 2005. – 23 с.
13. Леонова, Е.В. Патофизиология системы крови : учеб. пособие / Е.В. Леонова, А.В. Чантурия, Ф.И. Висмонт ; Белорус. гос. мед. ун-т, Каф. патолог. физиологии. – Минск : БГМУ, 2009. – 128 с.
14. Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Биологические мембраны. – 2012. – Т.29, №4. – С. 238–252.
- 15.Любимов, А.В. Перспективы кардиопротекции с помощью ишемического прекондиционирования: гипоксия-индуцируемый фактор 1 — возможный молекулярный механизм и мишень для фармакотерапии / А.В. Любимов, Д.В. Черкашин, А.Е. Аланичев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2017. – Т.16, №6. – С. 139–147.
- 16.Лямина, С.В. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа / С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-5. – С. 930–935.
- 17.Матвеева, В.Г. Значение субпопуляций моноцитов крови и уровня экспрессии на их поверхности активирующих рецепторов врожденного иммунитета в патогенезе неинфекционного системного воспалительного

- ответа : автореф. ... канд. мед. наук / В.Г. Матвеева. – Кемерово, 2013. – 23 с.
18. Матвеева, В.Г. Проблемы и перспективы изучения субпопуляций моноцитов крови в патогенезе заболеваний, связанных с воспалением / В.Г. Матвеева, Е.В. Григорьев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, №4. – С.154–159.
19. Матвеева, В.Г. Субпопуляционный состав моноцитов прогностический маркер тяжелых осложнений системного воспалительного ответа после операции коронарного шунтирования / В.Г. Матвеева, А.С. Головкин, Е.В. Григорьев // Болезни органов кровообращения: фундаментальные и клинические аспекты. – 2014. – №4. – С. 5–12.
20. Молекулярные факторы нарушений иммунного ответа при туберкулезе легких / И.Е. Есимова, Т.Е. Кононова, П.А. Захарова и др. // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10(19), №2(1). – С. 402–404.
21. Монастырская, Е.А. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии / Е.А. Монастырская, С.В. Лямина, И.Ю. Малышев // Патогенез. – 2008. – Т. 6, №4. – С. 31–39.
22. Мухин, Н.А. Пропедевтика внутренних болезней : Учебник для медицинских вузов / Н.А. Мухин, В.С. Моисеев. – 2-е изд., доп. и перераб. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 847 с.
23. Неиммунологические функции макрофагов / Б.Г. Юшков, М.Т. Абидов, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева. – Екатеринбург, Уро РАН. – 2011. – 246 с.
24. Особенности динамики субпопуляционного состава моноцитов при активации / В.Г. Матвеева, А.С. Головкин, Е.В. Григорьев, Л.В. Антонова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), №4. – С. 1028–1034.
25. Потапнев, М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления / М.П. Потапнев // Иммунология. – 2015. – № 5. – С. 312–318.
26. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулезе легких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа / И.Е. Есимова, О.И. Уразова,



- В.В. Новицкий, Р.Р. Хасанова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – №3. – С.79–86.
- 27.Ризопулу, А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / А.П. Ризопулу, Г.Ф. Юсуфович // Инфекция и иммунитет. – 2012. – №3. – С. 581–586.
- 28.Роль окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе / М.Х. Шогенова, Р.А. Жетишева, А.М. Карпов и др. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2015. – № 2. – С. 17–21.
- 29.Рукавицын О.А., Гематология : национальное руководство [Электронный ресурс] / под ред. О. А. Рукавицына – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. – 784 с.
- 30.Салум, И. Методика определения уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови / И. Салум, О.А. Кочубей // Современные методы исследования в клинике внутренних болезней : Материалы конференции. – Харьков, 2014. – С. 74–75.
- 31.Сарбаева, Н.Н. Макрофаги: разнообразие фенотипов и функций, взаимодействие с чужеродными материалами / Н.Н. Сарбаева, Ю.В. Пономарева, М.Н. Милякова // Гены и клетки. – 2016. – №1. – С. 9–17.
- 32.Сахно, Л.В. Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активировано активированных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине / Л.В. Сахно, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных // Иммунология. – 2015. – № 4. – С. 242–246.
- 33.Сидоров, П.И. Алгоритм прогноза риска ишемической болезни сердца и роль психического стресса в возникновении заболевания / П.И. Сидоров, А.Г. Соловьев, И.А. Новикова // Российский кардиологический журнал. – 2007. – №5. – С. 88 –91.
- 34.Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования / В.Г. Матвеева, И.В. Кудрявцев, Е.В. Григорьев и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 4-5. – С. 305–312.

35. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.И. Есимова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – Т.15, №5. – С. 116–177.
36. Функциональная пластичность моноцитов/макрофагов в процессах восстановительной регенерации и остинфарктного ремоделирования сердца / В.В. Рябов, А.Э. Гомбожапова, Ю.В. Роговская и др. // Иммунология. – 2016. – Т. 37, № 6. – С. 305–311.
37. Цветкова, О.А. Роль макрофагов и цитокинов в формировании воспаления и прогрессировании ХОБЛ / О.А. Цветкова, А.М. Абидов // Российские медицинские вести. – 2010. – Т. XV, №3. – С. 21–25.
38. Цитокины как индукторы постперфузионной системной воспалительной реакции у кардиохирургических больных с различной продолжительностью коронарной патологии / С.П. Чумакова, О.И. Уразова, В.М. Шипулин и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, № 4. – С. 260–268.
39. Цитофлуориметрическое изучение мембранных рафтов на субпопуляциях моноцитов человека при атеросклерозе / М.А. Челомбитько, В.С. Шишкина, О.П. Ильинская и др. // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2014. – №4 (23). – С. 86–94.
40. Черешнев, В.А. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, №1-2. – С. 9–20.
41. Черешнев, В.А. Иммунологические механизмы локального воспаления / В.А. Черешнев, М.В. Черешнева // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, №6. – С. 557–568.
42. Чикина, С.Ю. Бронхиальная обструкция: бронхиальная астма или хроническая обструктивная болезнь легких? / С.Ю. Чикина // Астма и аллергия. – 2016. – №4. – С. 8–12.
43. Чучалин, А.Г. Неотложные состояния. Диагностика и лечение. Справочное руководство / А.Г. Чучалин, С.Н. Авдеев; под ред. Е.И. Чазова. – Москва :

- ГЭОТАР-медиа, 2002. – С. 173–183.
- 44.Шварц, Я.Ш. Фиброзный процесс при атеросклерозе / Я.Ш. Шварц, Е.А. Чересиз // Атеросклероз. – 2011. – Т. 7, №2. – С. 57–66.
- 45.Шляхто, Е.В. Кардиология. Национальное руководство. Краткое издание / Шляхто Е.В. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 816 с. : ил.
- 46.Ярилин, А.А. Иммунология : учебник / А.А. Ярилин. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с. : ил.
- 47.A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo / C.E. Arnold, C.S. Whyte, P. Gordon et al. // Immunology. – 2014. – Vol. 141, N 1. – P. 96–110.
- 48.Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease [Electronic resource] / W.D. Cornwell, V. Kim, X. Fan et al. // BMC Pulm. Med. – 2018. – Vol. 18. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6003040/>.
- 49.Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to Mycobacterium tuberculosis / A. Kahnert, P. Seiler, M. Stein et al. // Eur. J. Immunol. – 2006. – Vol. 36. – P. 631–647.
- 50.Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection / I. Retamales, W.M. Elliott, B. Meshi, H.O. Coxson, P.D. Pare, F.C. Sciruba, R.M. Rogers, S. Hayashi, J.C. Hogg // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2001. – Vol. 164, N 3. – P. 469–473.
- 51.An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile [Electronic resource] / A.R. Pinto, R. Paolicelli, E. Salimova et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3349649/>.
- 52.An intact canonical NF- $\kappa$ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia / S.F. Fitzpatrick, M.M. Tambuwala, U. Bruning et al. // J. Immunol. – 2011. – Vol. 186. – P. 1091–1096.
- 53.An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of

- patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy / G.P. Fadini, S.V. de Kreutzenberg, E. Boscaro et al. // *Diabetologia*. – 2013. – Vol. 56, N 8. – P. 1856–1866.
54. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD / M. Plataki, E. Tzortzaki, P. Ryttila et al. // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2006. – Vol. 1, N 2. – P. 161–171.
55. Benoit, M. Macrophage Polarization in Bacterial Infections / M. Benoit, B. Desnues, J.L. Mege // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, N 6. – P. 3733–3739.
56. Billiau, A. Interferon-gamma: a historical perspective / A. Billiau, P. Matthys // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol. 20, N 2. – P. 97–113.
57. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T cell responses / D. Tzachanis, A. Berezovskaya, L.M. Nadler et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 1465–1473.
58. Bobryshev, Y.V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis / Y.V. Bobryshev // *Micron*. – 2006. – Vol. 37, N 3. – P. 208–222.
59. CD14 + CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels / A. Schlitt, G.H. Heine, S. Blankenberg et al. // *Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 92. – P. 419–424.
60. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis / C. Poitou, E. Dalmas, M. Renovato et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, N 10. – P. 2322–2330.
61. Circulating CD14+CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris / Y. Ozaki, T. Imanishi, A. Taruya et al. // *Circ. J.* – 2012. – Vol. 76. – P. 2412–2418.
62. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients [Electronic resource] / R. Aldonyte, L. Jansson, E. Piitulainen, S. Janciauskiene // *Respir. Res.* – 2003. – Vol. 4. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239032/>.

63. COPD monocytes demonstrate impaired migratory ability [Electronic resource] / A.K. Ravi, J. Plumb, R. Gaskell et al. // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18, N 1. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425971/>.
64. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation / H. Xu, A. Manivannan, I. Crane et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – P. 1166–1174.
65. Davey, H. Flow cytometry for clinical microbiology / H. Davey // *CLI.* – 2004. – N 2/3. – P. 12–15.
66. Davies, L.C. Tissue-resident macrophages: then and now / L.C. Davies, P.R. Taylor // *Immunology.* – 2015. – Vol. 144, N 4. – P. 541–548.
67. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis / C. Stockmann, A. Doedens, A. Weidemann et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 456. – P. 814–818.
68. Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice / J.C. Leemans, N.P. Juffermans, S. Florquin et al. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166, N 7. – P. 4604–4611.
69. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells / F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung et al. // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 656–661.
70. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction / T. Heidt, G. Courties, P. Dutta et al. // *Circ Res.* – 2014. – Vol. 115. – P. 284–295.
71. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation / C.J. Hu, L.Y. Wang, L.A. Chodosh et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 9361–9374.
72. Dysregulated Functions of Lung Macrophage Populations in COPD [Electronic resource] / T.S. Kapellos, K. Bassler, A.C. Aschenbrenner et al. // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5835245/>.
73. Eliasson, P. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be / P. Eliasson, J.I. Jonsson // *J. Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 222, N 1. – P. 17–

- 22.
74. Elliott, M.R. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses / M.R. Elliott, K.M. Koster, P.S. Murphy // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 198, N 4. – P. 1387–1394.
75. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases / R.H. Straub, M. Cutolo, F. Buttgerit, G. Pongratz // *J. Intern. Med.* – 2010. – Vol. 267. – P. 543–560.
76. Epelman, S. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair / S. Epelman, P.P. Liu, D.L. Mann // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 117–129.
77. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue / C. Dame, H. Fahnenstich, P. Freitag et al. // *Blood.* – 1998. – Vol. 92, N 9. – P. 3218–3225.
78. Fandrey, J. Oxygen-dependent and tissuespecific regulation of erythropoietin gene expression / J. Fandrey // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – Vol. 286, N 6. – P. R977–R988.
79. Functions of human monocyte and lymphocyte subsets obtained by countercurrent centrifugal elutriation: differing functional capacities of human monocyte subsets / T. Yasaka, N.M. Mantich, L.A. Boxer, R.L. Baehner // *J. Immunol.* – 1981. – Vol. 2. – P. 1515–1518.
80. Galectin-2 induces a proinflammatory, anti-arteriogenic phenotype in monocytes and macrophages [Electronic resource] / C. Yildirim, D.Y. Vogel, M.R. Hollander et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 4. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4401781/>.
81. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potial in breast cancer / A. Irie, A. Yamauchi, K. Kontani et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, N 8. – P. 2962–2968.
82. Galectin-9 modulates immunity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma / E.A. Enninga, W.K. Nevala, S.G. Holtan et al. // *Melanoma Res.* – 2016. – Vol. 26, N 5. – P. 429–441.
83. Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function /

- D. Paclik, L. Werner, O. Guckelberger et al. // *Cell. Immunol.* – 2011. – Vol. 271. – P. 97–103.
84. Galectins in atherosclerotic disease / S. Al-Ansari, C.J. Zeebregts, R.H. Slart et al. // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2009. – Vol. 19. – P. 164–169.
85. Galectins: Key Players at the Frontiers of Innate and Adaptive Immunity / V.C. Martínez, M.A. Toscano, N. Pinto, G.A. Rabinovich // *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* – 2018. – Vol. 30, N. 172. – P. SE97–SE107.
86. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets / K.L. Wong, J.J. Tai, W.C. Wong et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – P. e16–e31.
87. Ginhoux, F. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis / F. Ginhoux, M. Guillemins // *Immunity.* – 2016. – Vol. 44, N 3. – P. 439–449.
88. Gordon, S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3, N 1. – P. 23–35.
89. Grage-Griebenow, E. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets / E. Grage-Griebenow, H.D. Flad, M. Ernst // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – Vol. 69. – P. 11–20.
90. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities : implications for CSF blockade in inflammation / A.J. Fleetwood, T. Lawrence, J.A. Hamilton, A.D. Cook // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, N 8. – P. 5245–5252.
91. Grimshaw, M.J. Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation – a potential mechanism / M.J. Grimshaw, F.R. Balkwill // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – P. 480–489.
92. Haddad, J.J. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha / J.J. Haddad, H.L. Harb // *Int. Immunopharmacol.* – 2005. – Vol. 5, N 3. – P. 461–483.
93. HIF transcription factors, inflammation, and immunity / A. Palazon, A. Goldrath, V. Nizet, R.S. Johnson // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41, N 4. – P. 518–528.

94. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF- $\alpha$  / J.E. Albina, B. Mastrofrancesco, J.A. Vessella et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. C1971–C1977.
95. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation / T. Cramer, Y. Yamanishi, B.E. Clausen et al. // *Cell.* – 2003. – Vol. 112. – P. 645–657.
96. HIF-1 $\alpha$  influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination / T. Bhandari, J. Olson, R.S. Johnson, V. Nizet // *J. Mol. Med.* – 2013. – Vol. 91. – P. 1199–1205.
97. Histamine induces the generation of monocyte-derived dendritic cells that express CD14 but not CD1a / N. Katoh, F. Soga, T. Nara et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2005. – Vol. 125. – P. 753–760.
98. Hokama, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease / A. Hokama, E. Mizoguchi, A. Mizoguchi // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 14. – P. 5133–5137.
99. Huang, L.E. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance / L.E. Huang, H.F. Bunn // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 19575–19878.
100. Hulsmans, M. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling / M. Hulsmans, F. Sam, M. Nahrendorf // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2015, N 93. – P. 149–155.
101. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display cholesterol handling but phagocytosis because of distinct activities of the PPAR and LXR $\alpha$  pathways / G. Chinetti-Gbaguidi, M. Baron, B.M. Amine et al. // *Circ. Res.* – 2011. – Vol. 108, N 8. – P. 985–995.
102. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors / J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard et al. // *Immunity.* – 2010. – Vol. 33. – P. 375–386.
103. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes / R. Matsumoto, H. Matsumoto, M. Seki et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 16976.
104. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of



- adaptation to hypoxia [Electronic resource] / M. Fangradt, M. Hahne, T. Gaber et al. // *Arthritis Res. Ther.* – 2012. – Vol. 14, N 4. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580576/>
105. Hypoxia and hypoxiainducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function / J. Jantsch, D. Chakravortty, N. Turza et al // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 4697–4705.
106. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function / E.N. McNamee, J.D. Korn, D. Homann, E.T. Clambey // *Immunol. Res.* – 2013. – Vol. 55. – P. 58–70.
107. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner / R.J. Anand, S.C. Gribar, J. Li et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 82. – P. 1257–1265.
108. Hypoxia inhibits macrophage migration / L. Turner, C. Scotton, R. Negus, F. Balkwill // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29. – P. 2280–2287.
109. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? / C. Strehl, M. Fangradt, U. Fearon et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – Vol. 95, N 2. – P. 233–241.
110. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators / M.A. Déry, M.D. Michaud, D.E. Richard // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 37, N 3. – P. 535–540.
111. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation / H.Z. Imtiyaz, E.P. Williams, M.M. Hickey et al. // *J Clin Invest.* – 2010. – Vol. 120, N 8. – P. 2699–2714.
112. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity / C.F. Nathan, H.W. Murray, M.E. Wiebe, B.Y. Rubin // *J. Exp. Med.* – 1983. – Vol. 158, N 3. – P. 670–689.
113. Imhof, B.A. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes / B.A. Imhof, M. Aurrand-Lions // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 432–

- 444.
114. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK / L. Balboa, M.M. Romero, E. Laborde et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2013. – Vol. 43, N 2. – P. 335–347.
115. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD / S.L. Traves, S.V. Culpitt, R.E. Russell et al. // *Thorax.* – 2002. – Vol. 57. – P. 590–595.
116. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells / H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Schuler et al. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 1213–1222.
117. Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function / M. Podinovskaia, W. Lee, S. Caldwell, D.G. Russell // *Cell Microbiol.* – 2013. – Vol. 15, N 6. – P. 843–859.
118. Integrated Functional Analysis of the Nuclear Proteome of Classically and Alternatively Activated Macrophages [Electronic resource] / J.E. Wiktorowicz, I.H. Chowdhury, S. Stafford, S. Choudhuri et al. // *Mediators of Inflammation.* – 2019. – Vol. 2019. – Article ID 348143019. – 19 p. URL : <https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/3481430/abs/>
119. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation [Electronic resource] / R.M. McLoughlin, J. Witowski, R.L. Robson et al. // *J. Clin Invest.* – 2003. – Vol. 112, N 4. – P. 598–607. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC171385/>.
120. Jenkins, S.J. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system / S.J. Jenkins, D.A. Hume // *Trends Immunol.* – 2014. – Vol. 35. – P. 358–367.
121. Kalliolias, G.D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies / G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2016. – Vol. 12, N 1. – P. 49–62.
122. Koh, M.Y. Passing the baton: the HIF switch [Electronic resource] /

- M.Y. Koh, G. Powis // *Trends Biochem. Sci.* – 2012. – Vol. 37, N 9. – P. 364–372. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818162/>.
123. Labonte, A.C. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases / A.C. Labonte, A.C. Tosello-Tramont, Y.S. Hahn // *Mol. Cells.* – 2014. – Vol. 37. – P. 275–285.
124. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway / W. Zhang, Y. Zhang, Y. He, X. Wang et al. // *Experimental cell research.* – 2019. – Vol. 376. N 2. – P. 124–132.
125. Liu, F.T. Galectins in acute and chronic inflammation / F.T. Liu, R.Y. Yang, D.K. Hsu // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1253. – P. 80–91.
126. Liu, F.T. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation / F.T. Liu, G.A. Rabinovich // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 1183. – P. 158–182.
127. Lung CD8+ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs [Electronic resource] / C.M. Freeman, F.J. Martinez, M.K. Han et al. // *Respir Res.* – 2013. – Vol. 14. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23374856/>.
128. Lung-function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease / P. Lange, B. Celli, A. Agusti et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 111–122.
129. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocyte and give rise to macrophages in atheromata / F.K. Swirski, P. Libby, E. Aikawa et al. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 195–205.
130. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium / I. Hilgendorf, L.M. Gerhardt, T.C. Tan et al. // *Circ. Res.* – 2014. – Vol. 114. – P. 1611–1622.
131. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas et al. // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41, N 1. – P. 14–20.

132. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis [Electronic resource] / J. Rojas, J. Salazar, M.S. Martinez et al. // *Scientifica (Cairo)*. – 2015. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600540/>.
133. Macrophage polarization drives granuloma outcome during mycobacterium tuberculosis infection / S. Marino, N.A. Cilfone, J.T. Mattila et al. // *Infect. Immun.* – 2014. – Vol. 83, N 1. – P. 324–338.
134. Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation / D.Y. Vogel, P.D. Heijnen, M. Breur et al. // *J. Neuroinflammation*. – 2014. – Vol. 11. – P. 23.
135. Martinez, F.O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment [Electronic resource] / F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000Prime Rep.* – 2014. – Vol. 6. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3944738/>.
136. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites / R.M. Anthony, J.F.Jr. Urban, F. Alem et al. // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12, N 8. – P. 955–960.
137. Mills, C.D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease / C.D. Mills // *Crit. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 32, N 6. – P. 463–488.
138. Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14(++)/CD16(+)/CD14(+)/CD16(++)) monocytes in rheumatoid arthritis patient / M. Korkosz, K. Bukowska-Strakova, S. Sadis et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – P. 5329–5330.
139. Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease / A.M. Zawada, K.S. Rogacev, S.H. Schirmer et al. // *Immunobiology*. – 2012. – Vol. 217. – P. 1273–1284.
140. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir / A.M. van der Laan, E.N. Ter Horst, R. Delewi // *Eur. Heart J.* – 2014. – Vol. 35,

- N 6. – P. 376–385.
141. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques / F. Tacke, D. Alvarez, T.J. Kaplan et al. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 185–194.
  142. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection [Electronic resource] / P. Sampath, K. Moideen, U.D. Ranganathan, R. Bethunaickan // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6077267/>.
  143. Monocyte derived macrophages matured under prolonged hypoxia transcriptionally up-regulate HIF-1alpha mRNA / K.J. Staples, F. Sotoodehnejadnematalahi, H. Pearson et al. // *Immunobiology.* – 2011. – Vol. 216. – P. 832–839.
  144. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: spotlights on chemotaxis and migration / M.C. Bosco, M. Puppo, F. Blengio et al. // *Immunobiology.* – 2008. – Vol. 213. – P. 733–749.
  145. Moore, K.J. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis / K.J. Moore, I. Tabas // *Cell.* – 2011. – Vol. 145. – P. 341–355.
  146. Mosser, D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D.M. Mosser, J.P. Edwards // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 958–969.
  147. Murdoch, C. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation / C. Murdoch, M. Muthana, C.E. Lewis. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 6257–6263.
  148. Murray, P.J. Macrophage polarization / Murray P.J. // *Annu. Rev. Physiol.* – 2017. – Vol. 79. – P. 541–566.
  149. Murray, P.J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets / P.J. Murray, T.A. Wynn // *Nature Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 11, N 11. – P. 723–737.
  150. Nahrendorf, M. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart / M. Nahrendorf, F.K. Swirski // *Circ. Res.* – 2013. – Vol. 112, N 12. – P. 1624–1633.

151. Natural killer cell subpopulations in putative resistant individuals and patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection / W. Barcelos, R. Sathler-Avelar, O.A. Martins-Filho et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 68, N 1. – P. 92–102.
152. Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis / S.R. Walmsley, A.S. Cowburn, M.R. Clatworthy et al. // *Blood.* – 2006. – Vol. 108. – P. 3176–3178.
153. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha / J. Rius, M. Guma, C. Schachtrup et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 453. – P. 807–811.
154. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe et al. // *Blood.* – 2010 – Vol. 116 – P. 74–80.
155. Novak, N. Engagement of Fc RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells / N. Novak, T. Bieber, N. Katoh // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 797–804.
156. Oeser, K. Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths / K. Oeser, C. Schwartz, D. Voehringer // *Mucosal Immunology.* – 2015. – Vol. 8. – P. 672–682.
157. Oliver, K.M. Regulation of NFkappaB signalling during inflammation: the role of hydroxylases / K.M. Oliver, C.T. Taylor, E.P. Cummins // *Hypoxia.* – 2009. – Vol. 11, N 1. – P. 215.
158. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers / J.S. Harrison, P. Rameshwar, V. Chang, P. Bandari // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 394.
159. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10 / J. Skrzeczynska-Moncznik, M. Bzowska, S. Loseke et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 152–159.
160. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages / A.A. Tarique, J. Logan, E. Thomas et al. // *Am. J.*

- Respir. Cell Mol. Biol. – 2015. – Vol. 53. – P. 676–688.
161. Pittman, R.N. Regulation of Tissue Oxygenation. / R.N. Pittman. – San Rafael (CA) : by Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. – 2 th ed. – 30 p.
  162. Poellinger, L. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens / L. Poellinger, R.S. Johnson // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2004. – Vol. 14. – P. 81–85.
  163. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity / E.P. Cummins, E. Berra, K.M. Comerford et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103. – P. 18154–18159.
  164. Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation / N. Suzuki, K. Gradin, L. Poellinger, M. Yamamoto // *Experimental Cell Research.* – 2017. – Vol. 356, N 2. – P. 182–186.
  165. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia / T. Schioppa, B. Uranchimeg, A. Sacconi et al. // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 1391–1402.
  166. Rolot, M. Macrophage activation and functions during helminth infection: recent advances from the laboratory mouse [Electronic resource] / M. Rolot, B.G. Dewals // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6051086/>.
  167. Santangelo, S. Myeloid commitment shifts toward monocytopoiesis after thermal injury and sepsis / S. Santangelo, R.L. Gamelli, R. Shankar // *Ann. Surg.* – 2001. – Vol. 233, N 1. – P. 97–106.
  168. Saunders, B.M. T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection / B.M. Saunders, H. Briscoe, W.J. Britton // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 137, N 2. – P. 279–287.
  169. Semenza, G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation / G.L. Semenza, G.L. Wang // *Mol. Cell. Biol.* – 1992. –

- Vol. 12. – P. 5447–5454.
170. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia / G.L. Semenza // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 88. – P. 1474–1480.
171. Senescent CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity / A. Merino, P. Buendia, A. Martin-Malo et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 186. – P. 1809–1815.
172. Sotoodehnejadnematalahi, F. Human activated macrophages and hypoxia: a comprehensive review of the literature / F. Sotoodehnejadnematalahi, B. Burke // *Iran J Basic Med Sci.* – 2014. – Vol.17, N 11. – P. 820–830.
173. Stansfield, B.K. Clinical significance of monocyte heterogeneity [Electronic resource] / B.K. Stansfield, D.A. Ingram // *Clin. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 4, N 5. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384980/>.
174. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset / A.M. Zawada, K.S. Rogacev, B. Rotter et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – P. e50–e61.
175. Tanaka, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – Vol. 6, N 10. – P. a016295.
176. The biology of monocytes and dendritlungic cells: contribution to HIV pathogenesis / V.S. Wacleche, C.L. Tremblay, J.-P. Routy, P. Ancuta // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10, N 2. – P. 65.
177. The CD14(bright) CD16<sup>+</sup> monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population / M. Rossol, S. Kraus, M. Pierer et al. // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64. – P. 671–677.
178. The CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction / L.D. Tapp, E. Shantsila, B.J. Wrigley et al. // *J. Thromb. Haemost.* – 2012. – Vol. 10, N 7. – P. 1231–1241.
179. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche / T. Simsek, F. Kocabas, J.K. Zheng et al. // *Cell Stem*



- Cell. – 2010. – Vol. 7, N 3. – P. 380–390.
180. The kinetics of circulating monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction associations with 2-year cardiovascular events [Electronic resource] / X. Zhou, X.L. Liu, W.J. Ji et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – Vol. 95, N 18. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863763/>.
181. The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis / P. Saha, B. Modarai, J. Humphries et al. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 9, N 2. – P. 109–118.
182. The mononuclear phagocyte system revisited / D.A. Hume, I.L. Ross, S.R. Himes et al. // *Leukoc. Biol.* – 2002. – Vol. 72. – P. 621–627.
183. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis / A.S. Jaipersad, G.Y. Lip, S. Silverman et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2014. – Vol. 63, N 1. – P. 1–11.
184. The Tim3-galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* / I. Sada-Ovalle, L. Chávez-Galán, L. Torre-Bouscoulet et al. // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 189, N 12. – P. 5896–5902.
185. Thiemann, S. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? / S. Thiemann, L.G. Baum // *Annual Review of Immunology*. – 2016. – Vol. 34, N 1. – P. 243–264.
186. Tim3-regulates inflammatory cytokine expression and Th17 cell response induced by monocytes from patients with chronic hepatitis B / J. Wang, C. Li, J. Fu, X. Wang et al. // *Scand. J. Immunol.* – 2019. – Vol. 89, N 5. – P. e12755.
187. Tissue-resident macrophages / L.C. Davies, S.J. Jenkins, J.E. Allen, P.R. Taylor // *Nat. Immunol.* – 2013. – Vol. 14, N 10. – P. 986–995.
188. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes / D. Hashimoto, A. Chow, C. Noizat et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38, N 4. – P. 792–804.
189. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB)

- patients of different severity / G. Fiorenza, L. Rateni, M.A. Farroni et al. // *Immunol. Lett.* – 2005. – Vol. 98, N 1. – P. 45–48.
190. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression / F.O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, A. Mantovani // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 7303–7311.
191. Tuder, R.M. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / R.M. Tuder, I. Petrache // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, N 8. – P. 2749–2755.
192. Tumor necrosis factor-alpha antagonist interferes with the formation of granulomatous multinucleated giant cells: new insights into *Mycobacterium tuberculosis* / S. Mezouar, I. Diarra, J. Roudier et al. // *Infection. Front. Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P. 1947.
193. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity / F. Geissmann, S. Gordon, D.A. Hume et al. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 453–460.
194. Wang, L.D. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells / L.D. Wang, A.J. Wagers // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 12, N 10. – P. 643–655.
195. Zhang, X. Macrophage activation by endogenous danger signals / X. Zhang, D.M. Mosser // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214. – P. 161–178.
196. Zhong, Z. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 / Z. Zhong, Z. Wen, J.E.Jr. Darnell.// *Science.* – 1994. – Vol. 264, N 5155. – P. 95–98.
197. Ziegler-Heitbrock, L. Toward a refined definition of monocyte subsets [Electronic resource] / L. Ziegler-Heitbrock, T.P. Hofer // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562996/>.