

## Иммунофенотип макрофагальной популяции при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких

Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кубышкин А.В., Ермола Ю.А., Кальфа М.А., Геращенко А.В., Крамарь Т.В.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского  
Россия, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования:** изучение иммунофенотипа макрофагальной популяции и механизмов их векторного перераспределения при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования явились фрагменты стенки каверны и перикавернозной легочной ткани прооперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза (ФКТ) легких ( $n = 163$ ). Все пациенты были разделены на две основные группы (с активным бактериовыделением (МБТ+,  $n = 84$ ) и клиническим абацелированием (МБТ-,  $n = 79$ )) для проведения иммуногистохимического исследования с панелью маркеров: макрофагов и гистиоцитов – CD68; сосудистого фактора роста А – VEGF-А; Т-хелперов CD4, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8.

**Результаты.** При анализе экспрессии маркера CD68 установлена популяционная неоднородность макрофагов в зависимости от интенсивности цитоплазматической реакции функциональной активности с различными локализационными и количественными характеристиками: высокоактивные (тип 1), умеренно активные (тип 2) и слабоактивные (тип 3). На основании реакции с сосудистым фактором роста А определено, что клетки VEGF<sup>+</sup> соответствуют слабоактивным макрофагам CD68<sup>+</sup> и локализуются на границе перехода специфической грануляционной ткани в фиброзный слой, перикавернозной зоне и интактной легочной ткани со статистически значимым преобладанием у пациентов с МБТ- ( $p < 0,05$ ). Независимо от активности бактериовыделения число клеток VEGF<sup>+</sup> в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелирует с количеством макрофагов CD68<sup>+</sup> в перикавернозной зоне ( $R = 0,68$ ) и обратно – с числом VEGF<sup>+</sup> диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ( $R =$  макрофагов 0,75). При этом CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> визуализируются в зоне CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> – в зоне скоплений клеток CD4<sup>+</sup>. Такой характер корреляционной взаимосвязи свидетельствует о перераспределении макрофагов во второй тип, обладающих ремоделирующим действием на окружающие ткани при потенцирующем участии клеток лимфоидной популяции.

**Ключевые слова:** фиброзно-кавернозный туберкулез, макрофаги, иммунофенотип, иммунитет, иммуногистохимия.

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

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Медицинской академии имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского (протокол № 11 от 23.10.1017).

✉ Голубинская Елена Петровна, e-mail: missive@mail.ru.

Для цитирования: Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кубышкин А.В., Ермола Ю.А., Кальфа М.А., Геращенко А.В., Крамарь Т.В. Иммунофенотип макрофагальной популяции при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 190–200. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>.

УДК 616.24-002.54:612.017:577.27

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>

## Immunophenotype of the macrophage population in fibrous, cavernous pulmonary tuberculosis

Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kubyshkin A.V., Yermola Yu.A., Kalfa M.A., Gerashchenko A.V., Kramar T.V.

*Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Crimean Federal University (CFU) named after Vernadsky 5/7, Lenin Blv., Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation*

### ABSTRACT

**Objective:** to study the immunophenotype of the macrophage population and the mechanisms of their vectorial redistribution in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis.

**Materials and methods.** The material for the study was fragments of the fibrous cavern wall and pericavernous lung tissue of the dead or surgical patients diagnosed with fibrous cavernous tuberculosis ( $n = 163$ ). All patients were divided into 2 main groups: patients with active bacteria excretion (MTB+,  $n = 84$ ) and patients with clinical abacillation (MTB–,  $n = 79$ ) for immunohistochemistry with a panel of markers for: macrophages and histiocytes – CD68; vascular growth factor A – VEGF-A; T-helpers – CD4, and T-cytotoxic lymphocytes – CD8.

**Results.** Following the analysis of CD68 expression, the population heterogeneity of macrophages was revealed depending on the intensity of the cytoplasmic reaction, functional activity, localization and quantitative characteristics. Three groups were identified: highly active, moderately active and weakly active. Based on the reaction with vascular growth factor A, it was determined that VEGF<sup>+</sup> cells correspond to weakly active CD68<sup>+</sup> macrophages and are located on the border between the specific granulation tissue and fibrous layer as well as in the pericavernous zone and intact lung tissue with a statistically significant predominance in patients with MTB– ( $p < 0.05$ ). Regardless of the scope of bacterial secretion, the number of VEGF<sup>+</sup> cells in the lymphoid follicle zone directly correlates with that of CD68<sup>+</sup> macrophages in the pericavernous zone ( $R = 0.68$ ) and indirectly correlates with the number of diffusely scattered VEGF<sup>+</sup> cells in the fibrous capsule ( $R = -0.75$ ). In the meantime, CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> are visualized in the zone of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, and CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>–</sup> – in the zone of CD4<sup>+</sup> cell clusters. Such correlation indicates the redistribution of macrophages into type 2, which has a remodeling effect on the surrounding tissues with the potentiating participation of lymphoid cells.

**Key words:** fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, macrophages, immunophenotype, immunity, immunohistochemistry.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of funding.** The authors state that they received no funding for the study.

**Compliance with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee at the Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky (Protocol No. 11 of 23.10.1017).

**For citation:** Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kubyshkin A.V., Yermola Yu.A., Kalfa M.A., Gerashchenko A.V., Kramar T.V. Immunophenotype of the macrophage population in fibrous, cavernous pulmonary tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 190–200. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-190-200>.

## ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост числа пациентов с различными формами туберкулезной инфекции, в том числе в ассоциации с ВИЧ-инфекцией, вызвал бум научных исследований в направлении иммунологии туберкулеза [1, 2]. Достоверно установлена взаимосвязь прогрессирования альтеративно-экссудативных реакций и уровня иммунодефицита по мере уменьшения количества клеток CD4<sup>+</sup> [3, 4]. Однако в условиях длительно протекающего туберкулезного процесса без коморбидной патологии отмечается формирование иммунопатологических состояний. Ряд зарубежных исследователей предполагают, что вторичная иммунологическая недостаточность при туберкулезе может быть детерминирована непосредственно *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) путем иницирующего воздействия на дендритные и другие антигенпрезентирующие клетки, в частности макрофаги, что запускает каскадный цикл выброса цитокинов, хемокинов и других активных веществ, изменяющих соотношение провоспалительных и противовоспалительных механизмов [5, 6].

В экспериментальных работах *in vitro* установлен факт популяционной функциональной неоднородности макрофагов и выделены два основных фенотипа. Считается, что макрофаги первого типа (M1) иницируют воспалительную реакцию, проявляя высокую цитотоксическую и бактерицидную активность и поддерживая Th1-зависимый иммунный ответ. В то же время клетки M2 участвуют в реструктуризации межклеточного матрикса за счет активизации межклеточных взаимодействий с фибробластами и эндотелиоцитами, приводя к разрастанию соединительной ткани и неоваскуляризации в очаге поражения [7–9].

Наличие данных о полиморфизме популяции макрофагов позволяет предположить, что последующая цепь клеточных взаимодействий и их синтетической активности приводит к формированию гиперчувствительности замедленного типа и необратимому ремоделированию легочной паренхимы с развитием деструктивных изменений в виде формирования полости распада и массивной диссеминации патогена [10]. Именно изучение функциональных особенностей макрофагов, их координации с другими клеточными элементами системы местной защиты легких (потенцирующее либо блокирующее воздействие на процессы коллагенообразования, неоваскуляризация, сурфактантная система) может позволить составить персональный макрофагальный профиль больного с возможностью оценки эффективности терапии либо прогрессирования заболевания. В связи с

чем целью нашего исследования явилось изучение иммунофенотипа макрофагальной популяции и механизмов их векторного перераспределения при фиброзно-кавернозном туберкулезе (ФКТ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования явились фрагменты стенки каверны и перикавернозной легочной ткани прооперированных по поводу ФКТ легких ( $n = 163$ ). Все пациенты были разделены на группы: группа 1 – ФКТ легких с активным бактериовыделением (МБТ+),  $n = 84$ ; группа 2 – ФКТ легких с клиническим абациллированием (МБТ–),  $n = 79$ . В качестве контрольной группы для сравнения морфологических показателей были использованы фрагменты легких 30 больных, умерших от патологии, не связанной с заболеваниями легких (инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения). Критерии включения пациентов в исследование: возраст 18–65 лет, отрицательные клинико-лабораторные данные наличия коморбидной патологии (вирусных гепатитов В, С и ВИЧ), обострения хронических заболеваний других органов и систем, информированное согласие.

Для стандартного гистологического исследования фрагменты стенки каверны, перикавернозной зоны и макроскопически интактной легочной ткани фиксировались в 10%-м нейтральном формалине с последующей парафинизацией и изготовлением серийных срезов толщиной 4–5 мм. Визуализация патологических изменений осуществлялась путем окраски гематоксилином и эозином [11].

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили по стандартизированной методике с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином (Menzel-Glaser, Германия) и реактивов компании Dako (Дания). ИГХ панель включала в себя следующие антитела: маркер макрофагов и гистиоцитов, кластер дифференцировки 68, макросиалин – CD68 (клон KP1), маркер сосудистого фактора роста А VEGF-A (клон VG1), маркер кластера дифференцировки лимфоцитов Т-хелперов CD4 (клон 4B12), маркер кластера дифференцировки лимфоцитов Т-цитотоксических CD8 (клон C8/144B). Система визуализации EnVision<sup>TM</sup>FLEX на автостейнере фирмы Dako.

Количественная оценка позитивных клеток проводилась с учетом зонального распределения (зона казеозного некроза, специфическая грануляционная ткань, фиброзный слой, перикаверно-

зная зона, дренирующий бронх, интактная легочная ткань) и характера взаимодействия с другими структурными элементами ткани легкого. Оценку количества клеток проводили в 10 полях зрения при увеличении 200.

Интенсивность экспрессии макросиалина (CD68) оценивали полуколичественным методом на основании выраженности окраски и количества гранул в цитоплазме по следующей схеме: слабая (мембранная экспрессия со слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы и рассеянным небольшим количеством зерен), умеренная (равномерно расположенные зерна в цитоплазме на фоне неравномерной мембранной реакции) и выраженная (интенсивная цитоплазматическая окраска с компактным расположением зерен).

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли с помощью светового микроскопа Olympus CX-41, Olympus digital camera C5050 zoom. Морфометрическая обработка полученных данных проводилась с помощью лицензионного программного обеспечения ImageJ.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программного пакета Statistica for Microsoft Windows, version 10.0. (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $SD$  – стандартное отклонение. Статистический анализ включал построение вариационных рядов количественных данных, определение нормальности распределения вариационных рядов с использованием критерия Колмогорова – Смирнова, вычисление среднего арифметического значения, среднеквадратического отклонения, ошибки средней величины, коэффициента вариации и величины отклонения показателя от контроля в

процентах. Статистическая значимость различий сравниваемых величин определялась при помощи однофакторного дисперсионного анализа, для сравнения двух независимых групп применяли двухвыборочный критерий Стьюдента. Для оценки статистической взаимосвязи рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе рутинного гистологического исследования установлено, что макрофагальная популяция имеет структурные и количественные особенности в зависимости от приближенности к очагу деструкции. Выделено несколько микроскопически идентифицируемых видов макрофагов, имеющих различную локализацию и функциональную активность: альвеолярные и эпителиоидные макрофаги, пенистые клетки, гигантские многоядерные клетки Пирогова – Лангханса. При анализе экспрессии маркера CD68 и в образцах VEGF легких изучаемых групп зафиксировано наличие стойкого диффузного окрашивания в прогенном слое.

При оценке клеточной экспрессии указанных маркеров установлено динамическое уменьшение количества CD68<sup>+</sup> макрофагов по мере удаления от очага некроза с пиковыми показателями в грануляционной ткани –  $143,45 \pm 5,27$  (ФКТ МБТ+) и  $117,32 \pm 3,03$  (ФКТ МБТ-). В прилегающей зоне эмфиземы  $9,16 \pm 0,45$ . При этом в случаях ФКТ МБТ- регистрировалась аналогичная динамика со статистически значимыми количественными межгрупповыми отличиями как относительно контрольной группы, так и ФКТ МБТ+ (рис. 1).

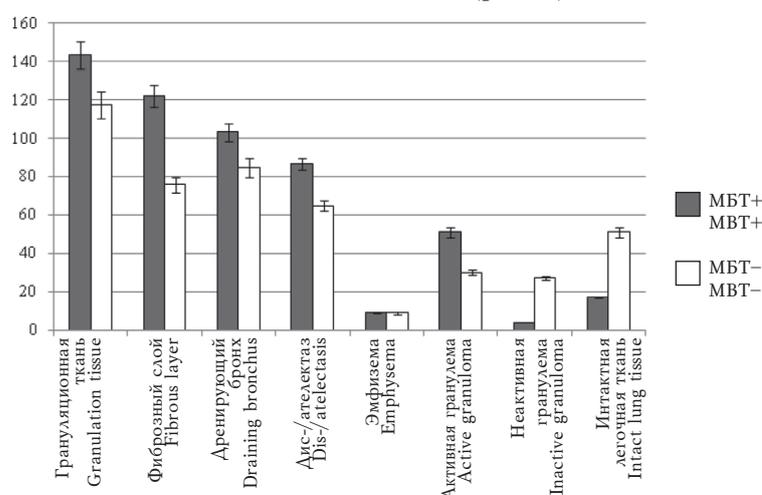


Рис. 1. Распределение макрофагов CD68<sup>+</sup> во фрагментах легочной ткани при фиброзно-кавернозном туберкулезе в зависимости от активности бактериовыделения

Fig. 1. Distribution of CD68<sup>+</sup> macrophages in the fragments of the lung tissue under fibrous cavernous tuberculosis depending on the scope of bacterial excretion

В зоне перехода пиогенного слоя в зону специфических грануляций фиксировалось абсолютное превалирование высоко- и умеренно активных CD68+ клеток независимо от активности бактериовыделения. В то же время в обеих группах слабоактивные клетки, как правило, располагались на границе перехода грануляционной ткани в фиброзный слой и соответствовали, в том чис-

ле, верифицированным гистологически пенистым клеткам и малым эпителиоидным клеткам.

Данная клеточная популяция с нечеткой мембранной экспрессией, слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы и немногочисленными рассеянными зернами составляла одну четверть всех позитивных макрофагов в группе ФКТ МБТ+ (табл. 1).

Таблица 1  
Table 1

Количественные характеристики популяции макрофагов в зависимости от интенсивности реакции с маркером CD68, $M \pm SD$									
Quantitative characteristics of the macrophage population depending on the intensity of the cytoplasmic reaction with CD68, $M \pm SD$									
Зона Zone	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> +				<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -				Контроль Control
	С W	У M	В H	Всего Total	С W	У M	В H	Всего Total	
Пиогенный слой Pyogenic layer	+++				+/-				23,7 ± 0,03
Грануляционная ткань Granulation tissue	33,50 ± 2,18	42,82 ± 3,04*	67,13 ± 1,93*	143,45 ± 7,01*	48,65 ± 1,13*	28,22 ± 0,97#	40,22 ± 1,08*#	117,09 ± 7,07*#	23,7 ± 0,03
Фиброзный слой Fibrous layer	37,48 ± 2,03*	30,51 ± 1,63	54,12 ± 2,01*	122,11 ± 5,79*	29,99 ± 0,41#	12,89 ± 0,08*#	32,71 ± 0,71#	75,59 ± 4,16*#	23,7 ± 0,03
Дренирующий бронх Draining bronchus	22,04 ± 1,01	21,36 ± 0,08	59,64 ± 2,21*	103,04 ± 4,69*	35,68 ± 3,22*#	30,08 ± 2,21#	18,68 ± 0,04*#	84,44 ± 4,74*#	23,7 ± 0,03
Дис-/ателектаз Dis-/atelectasis	19,08 ± 0,05	29,32 ± 1,01	38,34 ± 2,02*	86,74 ± 3,18*	24,21 ± 0,33	22,35 ± 0,12#	18,36 ± 0,11*#	64,92 ± 2,71*#	23,7 ± 0,03
Эмпфизема Emphysema	3,91 ± 0,03*	1,98 ± 0,01*	3,27 ± 0,01*	9,16 ± 0,49*	3,95 ± 0,24*	2,04 ± 0,13*	3,11 ± 0,11*	9,10 ± 0,74*	23,7 ± 0,03
Активная гранулема Active granuloma	5,42 ± 0,03*	8,05 ± 0,23*	45,09 ± 1,43*	58,56 ± 2,72*	3,49 ± 0,32*	7,72 ± 0,09*	37,51 ± 1,16*	48,72 ± 2,31*	23,7 ± 0,03
Неактивная гранулема Inactive granuloma	13,16 ± 0,03*	4,01 ± 0,04*	10,09 ± 0,76*	27,26 ± 1,10*	9,27 ± 0,34*	2,11 ± 0,02*	6,94 ± 0,26*#	18,32 ± 0,02*#	23,7 ± 0,03
Интактная легочная ткань Intact lung tissue	21,78 ± 0,03	17,23 ± 0,36*	12,24 ± 0,21*	51,23 ± 2,63*	10,89 ± 1,11*#	10,28 ± 0,56*#	9,02 ± 0,12*	30,19 ± 1,29*#	23,7 ± 0,03

Примечание. С – слабоактивные макрофаги, У – умеренно активные макрофаги, В – высокоактивные макрофаги; +++ – выраженная реакция, +/- – слабая реакция.

\*различие по отношению к группе контроля; # различие по отношению к группе с активным бактериовыделением ( $p < 0,05$ ).  
Note. C-weakly active macrophages, M – moderately active macrophages, H – highly active macrophages; +++ – pronounced reaction, +/- – weak reaction.

\*statistically significant difference as opposed to the control group; # statistically significant difference as opposed to the group with intense bacterial excretion ( $p < 0,05$ ).

При анализе экспрессии CD68 у пациентов с клиническим абаццированием данные клеточные соотношения варьировались в зависимости от наличия либо отсутствия пиогенного слоя. Так, у пациентов с повышенной реактивностью (неравномерные наложения казеозных масс на внутренней стенке каверны) третью часть всех макрофагов

составляли слабоактивные. Однако у пациентов с двухслойной каверной количество высоко- и слабо активированных клеток в большинстве случаев выравнивалось (соотношение 1 : 1) за счет стабилизации экссудативно-альтеративных процессов.

В результате анализа ИГХ реакции с маркером VEGF-A в стенке каверны установлена

стойкая диффузная окраска казеозного некроза. Цитоплазматическая экспрессия зафиксирована в клетках гистиоцитарного происхождения, в ре-

зультате чего нами было определено два иммунофенотипа макрофагов: тип 1 (CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>-</sup>) и тип 2 (CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup>) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2  
T a b l e 2

Количественные характеристики иммунопозитивных VEGF-A и макрофагов CD68 по отношению к очагу специфического воспаления, $M \pm SD$						
Quantitative characteristics of immunopositive VEGF-A and CD68 macrophages with relation to the focus of specific inflammation, $M \pm SD$						
Зона Zone	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> +		<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -		Контроль Control	
	VEGF-A	CD68	VEGF-A	CD68	VEGF-A	CD68
Пиогенный слой Pyogenic layer	+++	+++	+/-	+/-	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Грануляционная ткань Granulation tissue	33,50 ± 1,03*	143,45 ± 7,01*	43,12 ± 1,12*	117,31 ± 7,08*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Фиброзный слой Fibrous layer	38,01 ± 1,15*	122,11 ± 5,79*	29,41 ± 0,83*	75,71 ± 4,17*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Дренирующий бронх Draining bronchus	35,54 ± 1,87*	103,05 ± 4,69*	84,69 ± 3,51*#	84,69 ± 4,75*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Дис-/ателектаз Dis-/atelectasis	42,12 ± 1,01	86,74 ± 3,19*	47,24 ± 1,82*	64,92 ± 2,71*#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Эмфизема Emphysema	8,01 ± 0,82	9,16 ± 0,45*	7,30 ± 0,38	9,10 ± 0,74*	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30
Интактная легочная ткань Intact lung tissue	42,51 ± 1,49*	51,24 ± 2,63*	29,75 ± 1,01*#	30,19 ± 1,30#	10,02 ± 0,19	23,67 ± 1,30

\* различие по отношению к группе контроля ( $p < 0,05$ ); # различие по отношению к группе с активным бактериовыделением ( $p < 0,05$ ).

\*statistically significant difference as opposed to the control group ( $p < 0.05$ ); # statistically significant difference as opposed to the group with intense bacterial excretion ( $p < 0.05$ ).

Клетки CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>-</sup> локализовались преимущественно в зоне специфической грануляционной ткани на границе с пиогенным слоем и верифицировались как высоко или умеренно активированные. Слабоактивные CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> фиксировались на границе перехода грануляций в фиброзный слой.

На границе фиброзного слоя и окружающей перикавернозной зоны в обеих группах микроскопически определялась выраженная лимфоидная инфильтрация с формированием лимфоидных фолликулов как с активными светлыми герминативными центрами, так и относительно мноморфными по своей структуре. Во всех наблюдениях установлено, что из общего числа позитивно окрашенных макрофагов в фиброзном слое 70% локализованы в непосредственной близости от лимфоидных формирований.

Количество клеток VEGF<sup>+</sup> в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелировало с количеством макрофагов CD68<sup>+</sup> в перикавернозной зоне ( $R = 0,68$ ) и отмечалась отрицательная корреляционная

связь по отношению к количеству VEGF<sup>+</sup> диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ( $R = -0,75$ ). Клетки CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> визуализировались в зоне CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>-</sup> – в зоне скоплений клеток CD4<sup>+</sup> (рис. 2).

У всех пациентов группы ФКТ МБТ+ в дренирующем бронхе с типичным трехслойным строением максимальное количество высокоактивных макрофагов CD68 определялось в устье – (103,00 ± 1,2) позитивно окрашенных клетки. В окружающих участках серозной пневмонии регистрировался высокий уровень ИГХ экспрессии CD68 в виде очаговых скоплений высокоактивных (38,34 ± 1,1) и умеренно активных (29,32 ± 0,8) альвеолярных макрофагов и пенистых клеток, что свидетельствует об активизации гистиоцитарного пула в связи с прогрессией воспаления.

В участках частичного либо тотального спадения альвеол наблюдалась экспрессия высокоактивных альвеолярных макрофагов CD68<sup>+</sup> в небольшом количестве, в основном фиксированных в альвеолярных нишах. В строме альвеолярных

перегородок зоны дистелектаза среди хронического лимфо-гистиоцитарного инфильтрата определялось около 22% тканевых макрофагов

CD68<sup>+</sup> с низкой функциональной активностью (19,08 ± 0,7), которые соответствовали клеткам VEGF<sup>+</sup> (рис. 3).

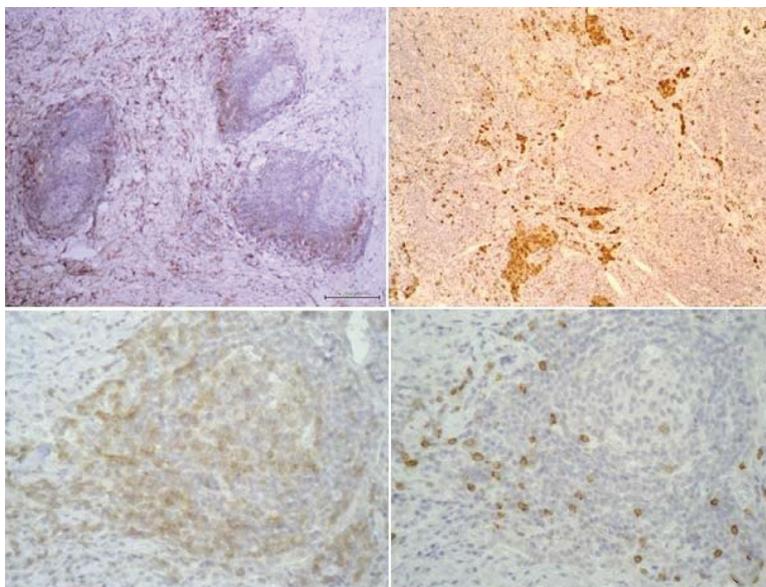


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с маркерами VEGF-A: a – CD68, ×200; b – CD4, ×200; c – CD8, ×400; d – в фиброзном слое каверны в области лимфоидных агрегатов, ×400

Fig 2. Immunohistochemical reaction with markers of VEGF-A: a – CD68, ×200; b – CD4, ×200; c – CD8, ×400; d – in the fibrous cavern layer in the area of lymphoid cell aggregates, ×400

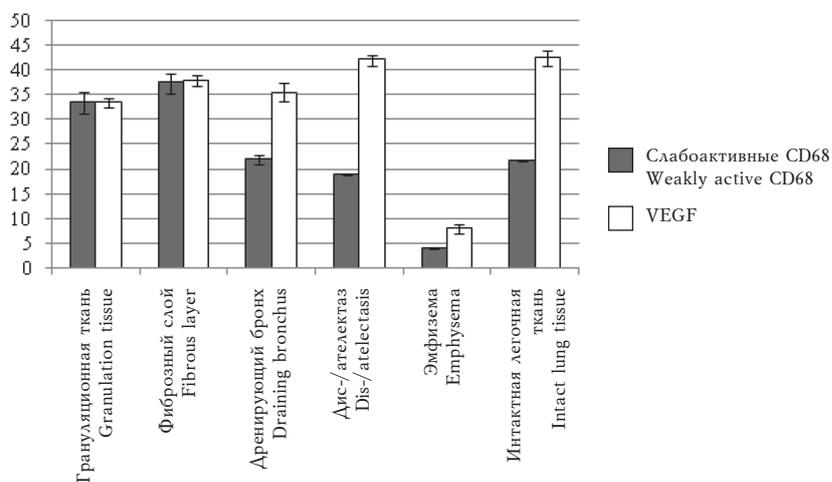


Рис. 3. Распределение слабоактивных макрофагов CD68<sup>+</sup> в сопоставлении с VEGF<sup>+</sup> клетками при фиброзно-кавернозном туберкулезе *Mycobacterium tuberculosis* +

Fig. 3. Distribution of weakly active CD68<sup>+</sup> macrophages compared with VEGF<sup>+</sup> cells under fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* +

В очагах эмфизематозного вздутия определялось минимальное количество позитивно окрашенных макрофагов ((9,16 ± 0,4) при ФКТ МБТ+ и (9,11 ± 0,4) при ФКТ МБТ-) в сравнении со всеми вышеописанными зонами независимо от активности бактериовыделения. В основном это были альвеолярные макрофаги со слабой функ-

циональной активностью, фиксированные на альвеолярной поверхности – (8,01 ± 0,4) и (7,29 ± 0,4) клеток VEGF<sup>+</sup> соответственно. В просвете расширенных альвеол с истонченными перегородками свободно лежащих позитивно экспрессирующих маркеров CD68 либо клеток VEGF не обнаружено.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В современной медицине имеется большое количество научных работ, посвященных изучению патоморфоза различных форм туберкулеза, часть из них имеет экспериментальный характер, и лишь немногочисленные исследования отображают патогенетические аспекты *in vivo*, что связано, в том числе, и со сложностью забора материала для исследования [12]. Многочисленные научные работы посвящены клиническим сопоставлениям показателей активности туберкулеза в периферической крови пациентов [13, 14]. Однако они не являются показательными с точки зрения специфичности процесса и его локализации, так как практически невозможно сформировать «чистую» группу пациентов без сопутствующей патологии и, соответственно, определить истинную причину прогрессирующей иммунологической недостаточности [5, 16]. С этой точки зрения иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования более перспективны, поскольку отражают состояние клеточного звена локального иммунитета, межклеточных взаимодействий и особенностей их регуляции в реальных условиях непосредственно в очаге поражения и в окружающей легочной паренхиме.

В нашем исследовании в результате проведенного комплексного морфологического анализа образцов легких пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом в зависимости от активности бактериовыделения установлена популяционная неоднородность клеток гистиоцитарного происхождения в зависимости от степени активации кластера дифференцировки 68 или макросиалина, который является членом семейства сквенджер-рецепторов (ScR) и широко используется как маркер макрофагов. Макросиалин, локализуясь на цитоплазматических гранулах, содержащих лизосомально-эндосомально ассоциированный мембранный гликопротеин 1 (LAMP-1), является показателем активации макрофагов в ответ на различные воспалительные стимулы [17].

Нами выделено три типа активности клеток CD68 на основании интенсивности реакции в условиях туберкулезного процесса: высокий, умеренный и слабый. Высокоактивные клетки CD68<sup>+</sup> с интенсивным мембранно-цитоплазматическим окрашиванием, компактными и тесно расположенными зернами в цитоплазме свидетельствуют о гиперактивации макрофагов на фоне хронической стимуляции бактериальным липополисахаридом и неэффективности фагоцитоза *M. tuberculosis* и персистенции ее внутриклеточного паразитирования.

Слабоактивные макрофаги CD68 с нечеткой мембранной экспрессией и слабым диффузным окрашиванием цитоплазмы, единичными рассеянными зернами либо готовятся к фагоцитозу микобактерий, либо находятся в состоянии покоя.

Уменьшение количества высокоактивных на основании интенсивности окраски клеток CD68<sup>+</sup> и параллельное нарастание пула слабоактивных макрофагов по мере отдаления от очага кавернозной деструкции позволило предположить наличие различных функциональных обязательств данных клеток не только в отношении фагоцитоза и презентации антигена иммунокомпетентными клетками, но и возможного противовоспалительного действия и ремоделирования окружающей легочной паренхимы.

Данное заключение базируется и на основании известного факта полиморфизма популяции макрофагов в условиях *in vitro* и *in vivo* у экспериментальных животных. Идентифицированы два фенотипа макрофагов: M1 (макрофаги 1-го типа, классически активированные) и M2 (макрофаги 2-го типа, альтернативно активированные) [18].

M1 – провоспалительные или цитотоксические, продуцируют интерлейкин (ИЛ) 12, индукцибельный оксид азота (iNOS), миелоид-зависимый протеин (MRP) 8/14 и фактор некроза опухоли (TNF) α, металлопротеиназу (MMP) 9, интерферон (ИФН) γ и потенцируют развитие клеток Th0 в Th1 [19]. M2 – противовоспалительные, продуцируют ИЛ-4, ИЛ-10, сосудистый фактор роста (VEGF), экспрессируют на поверхности маркера активации макрофагов CD163 и др. Это тип клеток интегрирован в Th2-ответ [20].

В нашем исследовании фрагменты легких пациентов с фиброзно-кавернозным туберкулезом клетки CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>-</sup> локализовались преимущественно в зоне специфической грануляционной ткани на границе с пиогенным слоем, в устье дренирующего бронха, очагах серозной пневмонии и верифицировались как высоко- или умеренно активные. Зафиксированное статистически значимое превалирование таких клеток у пациентов с активным бактериовыделением в сравнении с группой ФКТ МБТ – обусловлено интенсификацией цитотоксических механизмов в связи с прогрессией альтернативно-экссудативных реакций, массивной бактериальной инсеминацией и необходимостью активизации фагоцитоза.

Клетки VEGF<sup>+</sup> – слабоактивные макрофаги CD68<sup>+</sup> – фиксируются на границе перехода грануляций в фиброзный слой, перикавернозной зоне и интактной легочной ткани со статистически значимым преобладанием у пациентов с МБТ – (рис. 4).

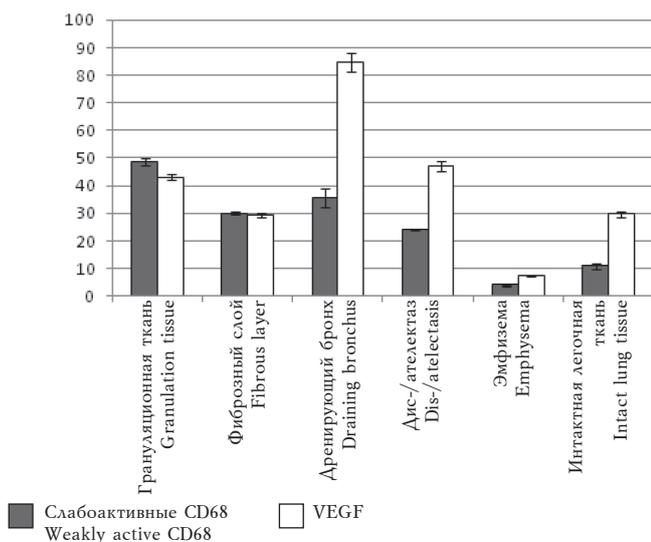


Рис. 4. Распределение слабоактивных макрофагов CD68<sup>+</sup> в сопоставлении с клетками VEGF<sup>+</sup> при фиброзно-кавернозном туберкулезе *Mycobacterium tuberculosis*–

Fig. 4. Distribution of weakly active CD68<sup>+</sup> macrophages compared with VEGF<sup>+</sup> cells under fibrous cavernous pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*–

Независимо от активности бактериовыделения клетки VEGF<sup>+</sup> в зоне лимфоидных фолликулов прямо коррелируют с количеством макрофагов CD68<sup>+</sup> в перикавернозной зоне ( $R = 0,68$ ) и обратно – с числом VEGF<sup>+</sup> диффузно рассеянных клеток в фиброзной капсуле ( $R = -0,75$ ). При этом CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>+</sup> визуализируются в зоне CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а CD68<sup>+</sup>/VEGF<sup>-</sup> – в зоне скопления клеток CD4<sup>+</sup>. Такой характер корреляционной взаимосвязи свидетельствует о перераспределении макрофагов во 2-й тип, обладающих ремоделирующим действием на окружающие ткани при потенцирующем участии клеток лимфоидной популяции.

По мере удаления от очага специфического воспаления происходит инверсия макрофагальной активности от провоспалительной к противовоспалительной. Такое функциональное перераспределение связано со снижением бактериальной инсеминации тканей и, возможно, является следствием индуктивной перестройки самих макрофагов микобактериями, направленной на одновременную маскировку от цитотоксического клеточного ответа и ремоделирование легочной ткани с целью создания комфортного микроокружения и достаточной аэрации в очаге специфического воспаления. Такая многозадачность реализуется с помощью механизма «ареста созревания фаголизосом», блокировки рецептора МНСI, активизации рецептора МНСII, что приводит к последующей дифференцировке клеток

Th0 в Th2 и перепрограммированию макрофагов в M2 с противовоспалительной функциональной направленностью. Как показано в наших предыдущих исследованиях процессов васкуляризации в условиях кавернозного туберкулеза, именно макрофаги VEGF<sup>+</sup> путем гиперпродукции сосудистого фактора роста А приводят к разрастанию неполноценных в функциональном отношении сосудов с несформированной базальной мембраной и повышенным индексом проницаемости непосредственно в очагах специфического воспаления [21, 22]. В то же время векторное популяционное перераспределение макрофагов во 2-й тип в интактной легочной ткани также приводит к неэффективной гемодинамической микроциркуляции за счет нарушения сосудистой проницаемости и нарастания тканевой гипоксии. Далее происходит формирование альвеоло-капиллярного блока и прогрессирующего пневмофиброза, замыкая «порочный круг» клинической прогрессии бронхолегочной недостаточности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях туберкулеза макрофаги представляют ключевую клеточную популяцию, определяющую не только первичное взаимодействие с *M. tuberculosis*, но и дальнейший каскад патологических реакций, приводящих ко вторичной иммунологической недостаточности, а также неконтролируемой деструкции легочной паренхимы и диссеминации процесса.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization. Global Tuberculosis report. 2017.
2. Cliff J.M., Kaufmann S.H., McShane H., van Helden P., O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunol. Rev.* 2015; 264 (1): 88–102.
3. Ziuzia Iu.R., Zimina V.N., Al'varesFigeroa M.V., Parkhomenko Iu.G., Dolgova E.A. The morphological characteristics of HIV-associated tuberculosis in relation to blood CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts. *Arkh. Patol.* 2014; Sept.-Oct.; 76 (5): 33–37.
4. Bhattacharya D., Danaviah S., Muema D.M., Akilimali N.A., Moodley P., Ndung'u T., Das G. Cellular architecture of spinal granulomas and the immunological response in tuberculosis patients coinfecting with HIV. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1120. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01120.
5. Huygen K. The immunodominant T-cell epitopes of the mycolyl-transferases of the antigen 85 complex of *M. tuberculosis*. *Front. Immunol.* 2014; 5: 1–11.
6. Jasenosky L.D., Scriba T.J., Hanekom W.A., Goldfeld A.E. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol. Rev.* 2015; 264: 74–87. pmid: 25703553.

7. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* 2014; 6: 13. Published 2014 Mar. 3. DOI: 10.12703/P6-13.
8. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5: 514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.
9. Serena Y.S. Tan, Mark A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Krasnow Development.* 2016; 143: 1318–1327. DOI: 10.1242/dev.129122.
10. Dorhoi A., Kaufmann S.H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin. Immunopathol.* 2016; Mar.; 38 (2): 153–166. Epub. 2015, Oct. 5.
11. Янин В.А., Бондаренко О.М., Сазонова Н.А. Методы исследования в цитологии и гистологии: учебно-методическое пособие. Ханты-Мансийск: БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 2015: 65. [Yanin V.L., Bondarenko O.M., Sazonova N.A. Methods of research in cytology and histology: teaching guide. Khanty-Mansiysk: BU “Khanty-Mansiysk State Medical Academy” Publ., 2015: 65 (in Russ.).]
12. Kim P.S., Makhene M., Sizemore C., Hafner R. Viewpoint: Challenges and opportunities in tuberculosis research. *J. Infect. Dis.* 2012; 205 Suppl. 2: 347–352.
13. Lyadova I.V., Pantelev A.V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 8545–8507.
14. Aryanpur M., Mortaz E., Masjedi M.R., Tabarsi P., Garssen J., Adcock I.M., Mozafarian A. and Sharifi H. Reduced phagocytic capacity of blood monocyte/macrophages in tuberculosis patients is further reduced by smoking. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology.* 2016; 15 (3): 174–182.
15. Yakar H.I., Gunen H., Pehlivan E., Aydogan S. The role of tuberculosis in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2017; 12: 323–329. DOI: 10.2147/COPD.S116086.
16. Kim H.J., Baek S., Kim H.J. The impact of smoking on airflow limitation in subjects with history of asthma and inactive tuberculosis. *PLoS One.* 2015; 10 (4). DOI: 10.1371/journal.pone.0125020.
17. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation.* 2017; 97: 4–13.
18. Gordon S., Pfyddemann A., Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 2014; 262: 36–55.
19. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5: 514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.
20. Chávez-Galán L., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages. *Front. Immunol.* 2015; 6: 263. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00263.
21. Голубинская Е.П., Филоненко Т.Г., Кальфа М.А., Ермола Ю.А. Морфологические особенности ангиогенеза при фиброзно-кавернозном туберкулезе. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2018; 8 (1): 16–19. [Golubinskaya E.P., Filonenko T.G., Kalfa M.A., Ermola Yu. A. Morphological features of angiogenesis in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2018; 8 (1): 16–19 (in Russ.).]
22. Голубинская Е.П., Крамарь Т.В. Морфофункциональное обоснование таргетной терапии блокаторами ангиогенеза при фиброзно-кавернозном туберкулезе. Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2018, май 23–25; Москва, Россия: 400–402. [Golubinskaya E.P., Kramar T.V. Morphofunctional substantiation of targeted therapy with blockers of angiogenesis in fibrous cavernous pulmonary tuberculosis. Materials of the international forum “Biotechnology: state and prospects of development”. 2018, May 23–25; Moscow, Russia: 400–402 (in Russ.).]

## Вклад авторов

Голубинская Е.П. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание рукописи статьи. Филоненко Т.Г. – проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение рукописи статьи. Кубышкин А.В. – окончательное утверждение рукописи статьи для публикации, общее руководство. Ермола Ю.А. – анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи статьи. Кальфа М.А. – статистическая обработка результатов и их интерпретация, забор биоматериала, написание рукописи статьи. Герашенко А.В. – забор биоматериала, проведение морфометрического исследования, анализ и интерпретация полученных результатов. Крамарь Т.В. – проведение морфометрического исследования, оформление рукописи статьи.

## Authors contribution

Golubinskaya E.P. – conception and design of the research, analysis and interpretation of the research results, drafting of the manuscript. Filonenko T.G. – critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript. Kubyshkin A.V. – final approval of the manuscript for publication, general guidance. Yermola Yu.A. – analysis and interpretation of the research results, editing of the manuscript. Kalfa M.A. – statistical processing of the results and their interpretation, sampling of biomaterial, drafting of the manuscript. Gerashchenko A.V. – sampling of biomaterial, carrying out of morphometric research, analysis and interpretation of the obtained results. Kramar T.V. – carrying out of the morphometric research, design and drafting of the manuscript.

## Сведения об авторах

**Голубинская Елена Петровна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-3917-924X.

**Филоненко Татьяна Григорьевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-4674-7391.

**Кубышкин Анатолий Владимирович**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-1309-4005.

**Ермола Юлианна Аркадьевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-4474-3714.

**Кальфа Маргарита Алексеевна**, ассистент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0002-7179-3402.

**Герашенко Алина Витальевна**, ассистент, кафедра патологической анатомии с секционным курсом, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0001-5076-2570.

**Крамарь Татьяна Вадимовна**, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID iD 0000-0003-2632-0451.

✉ **Голубинская Елена Петровна**, e-mail: missive@mail.ru.

## Authors information

**Golubinskaya Elena P.**, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, the Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3917-924X.

**Filonenko Tatyana G.**, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4674-7391.

**Kubyshkin Anatoly V.**, DM, Professor, Head of the General and Clinical Pathophysiology Department, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1309-4005.

**YermolaYulianna A.**, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4474-3714.

**Kalfa Margarita A.**, Assistant, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7179-3402.

**Gerashenko Alina V.**, Assistant, Department of Pathological Anatomy with Sectional Course, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5076-2570.

**Kramar Tatyana V.**, Student, Medical Academy named after S.I. Georgievsky, CFU named after Vernadsky, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2632-0451.

✉ **Golubinskaya Elena P.**, e-mail: missive@mail.ru.

Поступила в редакцию 05.11.2018  
Подписана в печать 17.12.2018

Received 05.11.2018  
Accepted 17.12.2018