

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТУБЕРКУЛЁЗА»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

**Линге
Ирина Андреевна**

**Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе на
микобактерии у мышей с различной генетически
обусловленной чувствительностью к инфекции**

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Апт Александр Соломонович

Москва, 2025

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
1.1. Актуальность темы	7
1.2. Степень разработанности темы исследования	8
1.3. Цель работы.....	10
1.4. Задачи исследования.....	10
1.5. Научная новизна.....	11
1.6. Теоретическая значимость исследования	13
1.7. Научно-практическая значимость исследования	13
1.8. Личный вклад автора	14
1.9. Положения, выносимые на защиту	14
1.10. Достоверность результатов проведенных исследований.....	15
1.11. Публикации по теме диссертации.....	16
1.12. Апробация работы.....	16
1.13. Объем и структура диссертации.....	17
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
2.1. Генетический контроль восприимчивости к туберкулезной инфекции и сопутствующих характеристик заболевания	18
2.2. Нейтрофилы при микобактериальных инфекциях.....	26
2.2.1. Двойственная роль нейтрофилов. Pro et contra	27
2.2.2. Факторы, регулирующие миграцию нейтрофилов	30
2.2.3. Взаимодействие нейтрофилов с другими клетками и воспаление при туберкулезе	32

2.2.4. Воздействие нейтрофилов на микобактерии.....	34
2.2.5. Апоптоз или некроз?.....	37
2.3. В-лимфоциты при микобактериальных инфекциях.....	38
2.3.1. Свидетельства участия В-лимфоцитов в иммунном ответе при туберкулезе	39
2.3.2. Фенотип В-лимфоцитов при туберкулезе	40
2.3.3. Взаимодействие В-лимфоцитов с другими клетками.....	42
2.3.4. В-клеточные фолликулы	46
2.3.5. Цитокины, продуцируемые В-лимфоцитами	48
2.3.6. Антитела и туберкулез	49
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
3.1. Лабораторные животные	55
3.2. Микобактериальные культуры.....	56
3.3. Заражение микобактериями.....	57
3.4. Определение количества микобактерий в органах зараженных животных .	58
3.5. Антигены	58
3.6. Среды и растворы.....	58
3.7. Получение суспензии клеток легкого	59
3.8. Получение суспензии клеток регионарных лимфатических узлов	60
3.9. Получение суспензии клеток селезенки	60
3.10. Получение перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и супернатантов клеток.....	60
3.11. Получение обогащенных популяций В-лимфоцитов и нейтрофилов.....	61

3.12. Гистологическая окраска тканей легкого	62
3.13. Окраска микобактерий аураминол	63
3.14. Антиген-специфический пролиферативный тест	63
3.15. Анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии	64
3.16. Выделение суммарной РНК	65
3.17. Получение кДНК	66
3.18. Определение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени	66
3.19. Анализ репертуаров BCR	66
3.20. Удаление нейтрофилов и В-лимфоцитов <i>in vivo</i>	67
3.21. Адоптивный перенос клеток	68
3.22. Определение уровня цитокинов и антител методом ELISA	69
3.23. Определение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , методом ELISPOT <i>in vitro</i>	70
3.24. Получение наивных лимфоцитов и специфических Т-линий	71
3.25. Неспецифические стимуляторы пролиферации Т-лимфоцитов	71
3.26. Блокаторы основных ингибиторов пролиферации	72
3.27. Изучение подвижности и взаимовлияния клеток в системе Transwell	72
3.28. Тест на включение [^3H]-тимидина	73
3.29. Определение пролиферации по включению CFSE	73
3.30. ВЭЖХ	73
3.31. ЯМР	74

3.32. Статистическая обработка результатов	75
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	76
4.1. Нейтрофилы при микобактериальных инфекциях	76
4.1.1 Удаление нейтрофилов снижает тяжесть течения ТБ	76
4.1.2 Истощение нейтрофилов способствует увеличению продукции IFN- γ	79
4.1.3 Нейтрофилы подавляют включение радиоактивного тимидина.....	80
4.1.4 Подавляющий включение метки фактор – низкомолекулярное устойчивое вещество	83
4.1.5. Фактор сНФ подавляет включение радиоактивной метки, но не пролиферацию клеток.....	84
4.1.6 Фактор, подавляющий включение [^3H]-тимидина – это тимидин	85
4.1.7 Нейтрофилы при воспалении, вызванном микобактериями <i>M. avium</i>	89
4.1.8 Уровень апоптоза и бактерицидные свойства нейтрофилов	92
4.2. В-лимфоциты при микобактериальных инфекциях.....	94
4.2.1. Динамика накопления В-лимфоцитов и формирования В-фолликулов у мышей с разной генетической чувствительностью к <i>M. tuberculosis</i>	94
4.2.2. В-лимфоциты мигрируют в легкое и размножаются <i>in situ</i>	96
4.2.3. Фенотип В-лимфоцитов легких при ТБ.....	98
4.2.4. Иммунологические характеристики легочных В-лимфоцитов.....	100
4.2.5. Определение специфичности моноклональных АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами	104
4.2.6. Различные изотипы иммуноглобулинов участвуют в иммунном ответе у чувствительных и резистентных к ТБ мышей.....	105
4.2.7. Крупные кластеры клонотипа IgA в репертуаре указывают на прогрессирующий иммунный ответ у устойчивых к ТБ мышей В6.....	107
4.2.8. TNF- α , продуцируемый В-лимфоцитами, необходим для формирования В- фолликулов, но не влияет на чувствительность мышей к микобактериям	109
4.2.9. Дефицит IL-6, продуцируемого В-клетками, приводит к повышению чувствительности к ТБ	111

4.2.10. Влияние дефицита IL-6, производимого В-клетками, на общий уровень IL-6 в легком при заражении ТБ	113
4.2.11. Влияние дефицита IL-6 в В-клетках на функции Т-лимфоцитов	115
4.2.12. Скопление В-фолликулов – признак патогенеза или протекции?	119
4.2.13. Удаление В-лимфоцитов у устойчивых мышей В6 в хронической стадии развития ТБ приводит к повышению чувствительности к инфекции	122
4.3. Взаимодействие В-лимфоцитов и нейтрофилов	130
4.3.1. Перенос костного мозга или клеток эмбриональной печени восстанавливает способность мышей СВА/Н к ответу на VCG	131
4.3.1. Клетки перитонеального экссудата мышей СВА/Н не активируют специфические Т-лимфоциты	132
4.3.2. У мышей СВА/Н большую часть VCG поглощают нейтрофилы	134
4.3.3. Перенос клеток СВА мышам СВА/Н тормозит миграцию нейтрофилов	135
4.3.4. Нейтрофилы мышей СВА/Н-хид обладают большей подвижностью	136
4.3.5. Разница в миграции нейтрофилов совпадает с динамикой экспрессии генов хемокинов в КПЭ, но не с уровнем соответствующих белков в перитонеальном экссудате	137
4.3.6. Удаление нейтрофилов in vivo восстанавливает эффективность вакцинации VCG у мышей СВА/Н-хид	140
5. ОБСУЖДЕНИЕ	143
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	167
7. ВЫВОДЫ.....	173
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	175
9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	177

1. Введение

1.1. Актуальность темы

Туберкулез (ТБ), вызываемый *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), и микобактериозы, индуцированные нетуберкулезными микобактериями, в том числе *Mycobacterium avium* (*M. avium*), занимают важнейшее место среди причин гибели людей от инфекционных заболеваний. Среди факторов, определяющих предрасположенность человека к развитию этих болезней, выделяются различная генетическая восприимчивость, диабет, табакокурение, возраст, разнообразные иммунодефициты, включая ВИЧ-инфекцию и СПИД, а также внешние факторы.

Принято считать, что Т-лимфоциты CD4⁺, продуцирующие IFN-γ, и активированные этим цитокином макрофаги являются основными клетками, участвующими в борьбе с микобактериями [Russell, 2007; O'Garra et al., 2013], хотя некоторые недавние исследования [Sakai et al., 2016] выдвинули серьезные вопросы к этому постулату. Как бы то ни было, в развитие иммунного ответа к микобактериям вовлекаются все клетки иммунной системы, в том числе нейтрофилы и В-лимфоциты, вклад которых в борьбу с инфекцией и патогенез заболеваний, вызванных микобактериями, считается менее значительным, хотя он изучен далеко не полностью. Тем не менее, на разных стадиях инфекционного процесса эти клетки вносят свой вклад в ответ и патологию легких и могут существенно влиять на исход заболевания. Считается, что одним из главных факторов патогенеза ТБ считается избыточное, плохо контролируемое воспаление лёгочной ткани, приводящее к её разрушению [Vyas and Goswami, 2017]. Толчком к развитию воспаления является иммунный ответ на возбудителя, который необходим для защиты хозяина, но должен оставаться под жёстким контролем, чтобы не закончился развитием тяжёлой патологии. Стоит также отметить, что одни и те же клетки иммунной системы могут проявлять защитные и патогенетические свойства в зависимости от стадии развития иммунного ответа. Подобная ситуация делает изучение иммунологических аспектов патогенеза

туберкулёза и степени вовлеченности в этот процесс нейтрофилов и В-лимфоцитов весьма важной научной и практической проблемой.

1.2. Степень разработанности темы исследования

Взгляды на роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в иммунном ответе на микобактериальные инфекции остаются противоречивыми. Нейтрофилы одними из первых мигрируют в очаг воспаления и фагоцитируют микобактерии. В части работ описывается их защитная роль. Накопление нейтрофилов у людей, контактировавших с больными ТБ, считается фактором протекции, поскольку продуцируемые нейтрофилами пептиды сдерживают рост бактерий. В некоторых моделях ТБ на животных показано, что на ранней стадии развития иммунного ответа нейтрофилы прямо или опосредованно способствуют активации Т-лимфоцитов CD4⁺, усиливают миграцию дендритных клеток в лимфоузлы, а элиминация нейтрофилов *in vivo* или дефицит их аттрактанта IL-17 нарушают первоначальное образование гранулем. С другой стороны, инфицирование чувствительных к микобактериям животных приводит к избыточному притоку нейтрофилов в легкие и формированию некротических гранулем, что влечет за собой быструю гибель животных. Вместе с тем нейтрофилы, в отличие от макрофагов, не способны эффективно уничтожать *M. tuberculosis* и, возможно, даже «экранируют» микобактерии от действия макрофагов-эффекторов [Eruslanov et al., 2005]. Фагоцитоз микобактерий нейтрофилами приводит к смерти нейтрофилов по пути апоптоза или некроза. При некрозе в область воспаления привлекаются все новые и новые клетки, также подверженные некрозу и высвобождающие все больше медиаторов воспаления, что приводит к деструкции ткани легкого и терминальной стадии развития инфекции. Таким образом, пришедшие в излишнем количестве нейтрофилы, могут способствовать избыточному воспалению и деструкции легочной ткани, что может иметь патогенетический эффект. При этом остается малоизученным, насколько зависит роль нейтрофилов в патогенезе ТБ от генетики хозяина и вирулентности бактерий.

Остается непонятным, зависит ли степень развития легочной патологии в хронической стадии от интенсивности нейтрофильного ответа в первые дни после инфицирования.

В-лимфоциты также относят к популяции клеток, которые традиционно не считают важными в ответе на микобактерии. Тем не менее, во многих работах показано, что при ТБ, а также микобактериозе, вызванном *Mycobacterium avium*, В-лимфоциты мигрируют в легочную ткань и формируют вокруг гранулем скопления, напоминающие В-фолликулы вторичных лимфоидных органов [Tsai et al., 2006; Kondratieva E. et al., 2010]. В модели ТБ на мышах показано, что дефицит В-клеток приводит к избыточному нейтрофильному воспалению на ранних стадиях развития ответа и к нарушениям в структуре гранулем [Maglione P., et al., 2007]. Кроме того, установлено, что наибольшему риску развития диссеминированного ТБ подвергаются дети, неспособные продуцировать антитела (АТ) к липоарабиноманнану (LAM) микобактерий [Costello A.M., 1992], но риск заболевания активным ТБ снижается, если могут производить АТ специфичные к секретируемому антигену микобактерий Ag85A [Fletcher H.A., 2016]. Вместе с тем, В-лимфоциты могут не только выполнять свою основную функцию – обеспечивать образование АТ – но также секретировать различные цитокины и хемокины и презентировать антигены Т-лимфоцитам, воздействуя таким образом на окружающие клетки и развитие иммунного ответа. Однако, какой вклад в это вносят легочные В-лимфоциты, находящиеся в непосредственном очаге инфекции, до сих пор остается малоизученным. Кроме того, так же, как и в случае с нейтрофилами, до конца не определено, зависит ли роль В-лимфоцитов от генетики хозяина, восприимчивости к инфекции, вирулентности микобактерий и стадии развития патологического процесса.

Таким образом, нейтрофилы и В-лимфоциты, не принимающие непосредственного участия в уничтожении микобактерий, тем не менее, оказывают влияние на общий характер воспаления, влияют друг на друга и другие типы клеток, участвуют в формировании очагов воспаления и гранулем и, как следствие, вносят свой вклад в ответ на инфекции, вызванные микобактериями. В связи с этим

необходимо провести гораздо больше тщательно контролируемых динамических экспериментальных исследований, чем их проведено и опубликовано до настоящего времени. Более того, это направление исследований должно обязательно включать эксперименты на животных с генетически различной восприимчивостью к разным микобактериальным инфекциям, поскольку уровень восприимчивости принципиально влияет на иммунный ответ и легочную патологию [Kondratieva E. et al., 2007, 2010; Logunova et al., 2015]. Этот аспект проблемы изучается в единичных лабораториях в мире. В связи с этим более глубокое понимание функций нейтрофилов и В-лимфоцитов, мигрирующих в легочную ткань при микобактериальных инфекциях и составляющих значительную часть популяции клеток легкого, а также их влияние на степень общего воспаления и друг на друга является актуальным.

1.3. Цель работы

Оценить роль В-лимфоцитов и нейтрофилов в обеспечении гуморального и клеточного иммунного ответа при заболеваниях, вызванных микобактериями *M. tuberculosis* и *M. avium*, в экспериментальных моделях на мышах с различной генетически обусловленной чувствительностью к инфекции.

1.4. Задачи исследования

1. Оценить влияние временного удаления нейтрофилов *in vivo* специфическими антителами на тяжесть течения инфекции и легочную патологию в модели ТБ на мышах генетически чувствительной линии I/St и более резистентной линии C57BL/6 (далее B6).
2. Сравнить уровень восприимчивости к инфекции, вызванной *M. avium*, у мышей двух конгенных по гену для β -цепи класса II комплекса H2 линий с разной чувствительностью к *M. tuberculosis* и оценить роль нейтрофилов при ответе на *M. avium*.

3. Определить продуцируемый нейтрофилами фактор, который подавляет включение [³H]-тимидина в ДНК, вмешиваясь в оценку пролиферации Т-лимфоцитов.
4. Оценить динамику накопления В-лимфоцитов и формирования В-фолликулов в легких при микобактериальных инфекциях в моделях на мышах с различной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*.
5. Провести анализ фенотипа и функций (маркеры клеточной поверхности, профиль классов и специфичность продуцируемых антител, цитокинов, антиген-презентирующие функции) В-лимфоцитов, формирующих В-фолликулы в легких при заражении мышей *M. tuberculosis*.
6. Оценить влияние продуцируемых В-клетками про-воспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α на формирование иммунного ответа и чувствительность при инфекциях, вызванными *M. tuberculosis* или *M. avium*, у мышей с избирательно выключенными генами для IL-6 или TNF-α в В-клетках.
7. Установить влияние удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ на течение инфекции у устойчивых мышей В6.
8. Определить причину неэффективного иммунного ответа при вакцинации BCG мышей CBA/N-xid с дефицитом В-лимфоцитов.

1.5. Научная новизна

Впервые показано, что избирательная элиминация нейтрофилов на ранних этапах после заражения *M. tuberculosis* приводит к снижению темпа размножения *M. tuberculosis* в легких, тяжести легочной патологии на поздних стадиях развития инфекции и увеличению срока выживания у генетически чувствительных к ТБ мышей.

Установлено, что β-цепь молекулы МНС-II комплекса H2 гаплотипа j отвечает за более устойчивый фенотип при заражении *M. avium*, что является оппозитным фенотипом по сравнению с заражением вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

Показано, что прибывающие в очаг воспаления нейтрофилы секретируют свободный тимидин, который может влиять на репликацию ДНК. Это явление описано впервые для данной популяции клеток.

Установлено, что при инфицировании высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* большее число В-лимфоцитов и В-фолликулов характерно для мышей более устойчивой линии, тогда как при заражении менее вирулентными микобактериями *M. avium* такой фенотип наблюдается у мышей более чувствительной линии.

Выявлено, что при ТБ уход В-клеток и исчезновение В-фолликулов у чувствительной линии мышей предшествует развитию некротического воспаления в легком, а длительное присутствие В-фолликулов в хронической стадии ТБ у устойчивых животных сопровождается контролируемым воспалением. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ приводит к повышению тяжести течения инфекции.

Показано, что легочные В-клетки выполняют все классические функции – эффективно презентуют микобактериальные антигены (МАГ) Т-клеткам, продуцируют АТ и различные про- и противовоспалительные факторы. Впервые получены гибридомы из В-клеток туберкулезного легкого и установлено, что большая часть клонов легочных В-лимфоцитов, выделенных у чувствительных к ТБ мышей, продуцируют АТ, не реагирующие с антигенами *M. tuberculosis*.

Впервые исследованы последовательности В-клеточных рецепторов (BCR) легочных В-лимфоцитов при ТБ. Показано, что у мышей чувствительной линии I/St формируются некрупные кластеры с преобладанием клонотипов IgM/IgG, тогда как у мышей устойчивой линии В6 – больше крупных кластеров преимущественно клонотипа IgA более ориентированных на антигены микобактерий.

Обнаружено, что TNF- α , продуцируемый В-лимфоцитами, необходим для формирования легочных В-фолликулов, но не определяет уровень чувствительности к *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Установлено, что при ТБ продукция IL-6 именно В-лимфоцитами определяет общий уровень IL-6 в легких, от которого зависит формирование своевременного

и полноценного Т-клеточного ответа (уровень специфических Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺, а также дифференцировка фолликулярных клеток CD4⁺CXCR5⁺), обеспечивающего эффективную борьбу с туберкулезной инфекцией и резистентный фенотип.

Продемонстрировано, что В-лимфоциты тормозят миграцию нейтрофилов у мышей. В условиях дефицита В-клеток, ускоренный приток нейтрофилов в область введения вакцины BCG мешает формированию эффективной противотуберкулезной защиты. Восстановление В-клеточной популяции или удаление нейтрофилов приводит к восстановлению вакцинного эффекта BCG.

1.6. Теоретическая значимость исследования

Работа носит экспериментальный характер и посвящена фундаментальной проблеме уточнения различных сторон патогенеза и его регуляции при микобактериальных инфекциях, вызванных *M. tuberculosis* и *M. avium*. Полученные данные в значительной степени расширяют имеющиеся знания о роли В-лимфоцитов и нейтрофилов в развитии иммунного ответа на микобактерии, а именно об участии указанных популяций клеток в обеспечении устойчивого фенотипа или развитии патологии в зависимости от вирулентности патогена и генетических особенностей хозяина.

1.7. Научно-практическая значимость исследования

Полученные результаты использовались в цикле лекций спецкурса «Иммуногенетика» и большом практикуме для студентов кафедры иммунологии биофака МГУ им. М.В. Ломоносова, а также используются в курсе «Инфекционная иммунология. Иммуногенетика» для аспирантов ФГБНУ «ЦНИИТ» и внедрены в лабораторную практику отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» и лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, а также используются при планировании и постановке экспериментов и интерпретации получаемых результатов.

Экспериментальные данные, полученные на мышах с оппозитной чувствительностью к *M. tuberculosis* и *M. avium*, указывают на возможные механизмы прогрессирующего течения инфекции у генетически чувствительных пациентов и определяют, какие новые параметры следует учитывать при иммунодиагностике и оценке эффективности лечения этих опасных заболеваний. Полученные данные о способности нейтрофилов секретировать свободный тимидин также должны учитываться при постановке пролиферативных тестов *in vitro* с участием нейтрофилов и исключить метод оценки пролиферации клеток по включению радиоактивно-меченного [³H]-тимидина. Кроме того, полученные данные о роли нейтрофилов в патогенезе туберкулеза могут служить теоретической основой для перепрофилирования уже имеющихся или разработки новых направленных на нейтрофилы препаратов для новых типов вспомогательной терапии для ТБ.

1.8. Личный вклад автора

Все научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены при личном участии автора и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Соискатель принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения диссертационного исследования: дизайне, разработке и планировании исследований, проведении экспериментов, обработке, анализе и интерпретации данных, подготовке публикаций по теме и апробации результатов исследования.

1.9. Положения, выносимые на защиту

1. Нейтрофилы являются патогенным фактором при инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, и препятствуют развитию защитного эффекта вакцинации BCG против ТБ.

2. В-лимфоциты, образующие фолликулы в легочной ткани при ТБ, действуют как один из факторов эффективного иммунного ответа, участвуя в контроле избыточного воспаления.

3. Роль нейтрофилов и В-лимфоцитов в патогенезе и защите при микобактериальных заболеваниях зависит как от генетического контроля восприимчивости к инфекции, так и от вирулентности возбудителя.

1.10. Достоверность результатов проведенных исследований

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, позволяющих определить существенность полученных экспериментальных данных с использованием методов математической статистики. Результаты большей части исследований опубликованы в рейтинговых международных журналах и прошли анонимное рецензирование (peer review). В работе использованы современные экспериментальные методы исследования, соответствующие поставленным цели и задачам. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, логически вытекают из результатов, проведенных с помощью комплексных иммунологических и генетических методов, включающих выведение определенных линий мышей с кондиционно нокаутированными генами, анализ методом проточной цитофлуориметрии, световой и флуоресцентной микроскопии, методы оценки пролиферации лимфоцитов, методы иммуногистохимии и морфологии, молекулярно-биологические тесты (ELISA, ELISPOT, qrtPCR, RNA-seq), химико-аналитических методов ВЭЖХ, масс-спектрометрии, ЯМР. Все исследования проведены с использованием современного сертифицированного и проверенного оборудования и международных протоколов. Полученные данные обрабатывались при помощи общепринятых статистических подходов, компьютерных программ Excel и GraphPadPrism и представлены в виде фотографий, графиков и таблиц. Методы статистики включали log-rank тест и критерий Гехана для сравнения выживаемости, а также непарный t-тест Стьюдента

и OneWay Anova с последующим Tukey пост-тестом. Статистически достоверными считались различия при $P < 0,05$.

1.11. Публикации по теме диссертации

По основным материалам диссертационного исследования опубликовано 36 печатных работ, в том числе 20 статей в рецензируемых международных и российских научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 глава в монографии, 15 публикаций в сборниках материалов конференций.

1.12. Апробация работы

Полученные результаты были также представлены в виде устных и стендовых докладов и обсуждены на российских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях (всего 25): на Всемирном иммунологическом конгрессе (IUIS) 2023, Кейптаун, ЮАР; на Всероссийских научных форумах с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 2023, 2007, 2006, Санкт-Петербург, Россия; на международных конференциях EMBO/Tuberculosis: From innovation to intervention 2022 и 2016, Париж, Франция; на онлайн-симпозиуме KeyStone Tuberculosis: Science Aimed at Ending the Epidemic, 2020; на международной конференции, посвященной 110-летию со дня основания Санкт-Петербургского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и 95-летию со дня присвоения Институту имени Пастера, 2018, Санкт-Петербург, Россия; на международных форумах Кох-Мечников 2016 и 2017, Москва, Россия; на IV конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров в рамках конкурса на звание "Молодой ученый года", 2015, Санкт-Петербург, Россия; на конференции «Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулёза взрослых и детей», 2014, Москва, Россия; на

международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и системная биология», 2014, Звенигород, Россия; на всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века», 2012, Москва, Россия; на международном симпозиуме «Emerging trends in tuberculosis research: biomarkers, drugs & vaccines», 2008, Дели, Индия; на конференции с международным участием «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», 2006, Санкт-Петербург, Россия.

1.13. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 226 страницах, содержит 43 рисунка и 2 таблицы. Работа включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Список литературы содержит 392 источника, из них 5 отечественных и 387 зарубежных.

2. Обзор литературы

2.1. Генетический контроль восприимчивости к туберкулезной инфекции и сопутствующих характеристик заболевания

В основе чувствительности к ТБ лежат разные факторы, в том числе генетические. Генетическое разнообразие людей в популяции во многом объясняет тот факт, что среди приблизительно четверти инфицированных на планете людей [Global tuberculosis report 2022. Geneva: WHO; 2022] лишь у 5-10% развивается активный ТБ в течение жизни.

Генетический анализ чувствительности ко многим инфекциям доказал свою высокую эффективность для определения ключевых клеток, молекул, сигнальных путей и генов в борьбе организма хозяина и паразита. Генетические исследования последнего времени свидетельствуют о том, что в формировании устойчивого к ТБ фенотипа участвует, как правило, не какой-то один, а ряд факторов, действующих синергически.

Большая часть генетических исследований в популяциях человека основана на поиске ассоциаций между развитием инфекционного процесса и увеличением или уменьшением частот аллельных полиморфизмов в генах-кандидатах, которые выбирают, исходя из экспериментальных данных или из общих соображений. Помимо этого, существует множество экспериментальных моделей ТБ на животных, позволяющих находить не только ассоциации, но и конкретные гены, отвечающие за чувствительность к инфекции. Течение ТБ у разных животных происходит по-разному. Рыбки *Danio rerio* удобны для изучения раннего формирования гранулем *in vivo*, поскольку покровы их личинок, на которых проводят исследования, прозрачны [Cambier C.J., et al., 2013, Volkman H.E., et al., 2010, Ramakrishnan L., et al., 2013]. У морских свинок и кроликов нетрудно добиться развития казеозной пневмонии, что соответствует одному из вариантов тяжелого течения инфекции у человека [Williams A, Orme IM., 2016]. Модель ТБ на макаках воспроизводит все возможные варианты развития патологии близкие к клиническим [Lin, P. L., et al., 2006], однако очевидно, что эта модель очень дорога.

Исследователи постоянно спорят об адекватности использования моделей, поскольку течение ТБ у животных не совпадает в точности по всем параметрам с развитием туберкулезной патологии у людей. Генетическая гетерогенность является фундаментальным свойством всех живых организмов. Внутривидовые вариации проявлений восприимчивости к различным инфекциям, в том числе к микобактериальной, характерны для всех млекопитающих [Fortin A., et al., 2007, Schurr E., Kramnik I., 2008]. Кроме того, здесь стоит отметить, что модели нужны для того, чтобы упростить исследуемую систему и сделать ее более управляемой. Таким образом, модель ТБ на животных не должна воспроизводить все особенности течения ТБ у людей, но быть достаточно адекватной, чтобы дать возможность изучать конкретные проявления заболевания и механизмы патогенеза в организме животного [Apt A., Kramnik I., 2009].

Патология туберкулезной инфекции значительно различается у разных индивидуумов. Это может быть образование одного или многих очагов воспаления с диссеминацией, разлитой процесс по типу казеозной пневмонии, формирование четко ограниченных туберкулом, появление фиброзных каверн и некоторые другие [Stek et al., 2018]. Базовым признаком туберкулезной патологии считается образование центрального скопления макрофагов, окруженного кольцом лимфоцитов, формирующих классическую гранулему [Basaraba, R. J., et al., 2008]. Значение гранулемы для развития заболевания неоднозначно. С одной стороны, гранулема отграничивает инфицированную область от здоровой ткани легкого [Saunders B. M., et al., 1999], предотвращая таким образом диссеминацию бактерий. С другой стороны, отграничение микобактерий структурной гранулемой является барьером для действия лекарств [Via L. E., et al., 2008, Kaplan G., et al., 2003]. Кроме того, внутри гранулемы создается гипоксичное пространство, способствующее формированию покоящихся дормантных форм микобактерий, нечувствительных к действию существующих лекарств. Помимо гипоксии, важной чертой патогенеза выступает приток в гранулему нейтрофилов, сопровождающийся быстрым некрозом содержимого гранулемы [Ulrich T., et al., 2004].

Стоит отметить, что в экспериментальных моделях ТБ на генетически чувствительных мышах многие черты легочной патологии, свойственные клиническому ТБ, воспроизводятся вполне адекватно [Apt A., Kramnik I., 2009]. При этом большое количество доступных реагентов, а также наличие множества конгенных, рекомбинантных, трансгенных и других линий мышей, позволяют проводить подробный анализ генетического и иммунологического контроля ТБ. Значительная доля информации о патогенезе, генетическом контроле и иммунном ответе при ТБ была получена в исследованиях, проведенных именно на лабораторных инбредных мышах. В этих экспериментах было продемонстрировано, что основные реакции врожденного и адаптивного иммунитета в ответ на микобактериальную инфекцию у людей и мышей сходны, что неудивительно, поскольку гомология геномов человека и мыши составляет 85%. В частности, защитная роль Т-лимфоцитов CD4⁺ и цитокинов IFN- γ и TNF- α при ответе на туберкулезную инфекцию у обоих видов установлена довольно давно [см. обзор North R.J. Jung Y.J., 2004]. Клинически, это четко соотносится с высоким риском туберкулеза для ВИЧ-инфицированных пациентов с сильно сниженным количеством Т-лимфоцитов CD4⁺ [Maartens G. and Wilkinson R. J., 2007]. Роль TNF- α подтверждается тем, что реактивация ТБ часто наступает после анти-TNF-терапии ревматоидного артрита [Keane J., et al., 2001]. Критически важное значение центрального противотуберкулезного цитокина IFN- γ подтверждается тем, что люди с редкими мутациями, приводящими к нарушениям в сигнальных путях по цепи IL-12 \rightarrow IFN- γ \rightarrow активация макрофага, крайне подвержены заболеванию ТБ [см. обзор Fortin A., et al., 2007].

У человека значимые ассоциации тяжести течения ТБ показаны для многих полиморфизмов генов иммунной системы. Позитивные или негативные ассоциации были показаны для генов *CD209*, *TLR1*, *TLR2* и *VDR*, кодирующих разные рецепторы иммунной системы, генов частично описанных выше цитокинов *IFNG*, *TNFA*, *IL10* и *IL1B*, нескольких аллелей множества генов комплекса HLA и других [Alcais A. et al., 2005, Azad A.K., et al., 2012, Remus N., et al., 2003]. Однако стоит отметить, что это лишь ассоциации, а не прямое доказательство участия гена-

кандидата. Более эффективный метод для изучения генов, отвечающих за чувствительность к ТБ у людей, – это комбинация исследований семей и метода полногеномных ассоциаций GWAS (Genome-wide association study) с последующим мета-анализом.

Одно большое исследование по поиску генетических факторов предрасположенности к ТБ в Марокко привело к особенно интересным наблюдениям. Было показано, что локус, контролирующий чувствительность к развитию легочного ТБ у взрослых, расположен в сегменте хромосомы 8q12-q13 [Baghdadi J.E., et al., 2006]. Проведя дополнительные исследования, авторы предположили, что этот локус контролирует не чувствительность, а скорее иммунологическую устойчивость, которая нарушается с возрастом и приводит к реактивации латентной инфекции. Наибольшая степень сцепления была обнаружена для SNP в промоторе гена *TOX*, кодирующего транскрипционный фактор, который играет важную роль в развитии и дифференцировке Т-лимфоцитов в целом и CD4⁺ Т-клеток, в частности [Grant A.V., et al., 2013, Aliahmad R., et al., 2008], что делает данный ген реальным кандидатом. Тем не менее, прямых свидетельств участия гена *TOX* в контроле ТБ пока нет. Более того, в эндемичных по ТБ странах высока частота доминантного аллеля, который явно связан с высокой восприимчивостью к инфекции. Это может объясняться какими-то неизвестными отборными преимуществами его носителей [Apt A., 2017].

Одно из наиболее убедительных исследований относительно связи полиморфизмов генов с чувствительностью к ТБ касается гена *SLC11A1* (*NRAMP1*), ортологом гена *Slc11a1* мыши. Ген *Slc11a1* кодирует белок, представляющий собой протонную помпу двухвалентных катионов железа в мембране фагосом макрофагов [Canonne-Hergaux F., et al., 1999, Forbes J.R., Gros P., 2001, Forbes JR, Gros P., 2003]. В результате исследований в разных странах и последующего мета-анализа было четко продемонстрировано, что полиморфизм по гену *SLC11A1* влияет на чувствительность к ТБ [Medina E., North R.J., 1996, Nikonenko B.V., et al., 1996, Meilang Q., et al., 2012], а также другому микобактериальному заболеванию – лепре [Hatta M. et al., 2010].

У мышей ген *Slc11a1* довольно слабо влияет на течение ТБ [Nikonenko B.V., et al., 1996], но выступает в роли основного регулятора восприимчивости к менее вирулентным микобактериям *Mycobacterium avium* [Nakamura R.M., et al., 1992, Kondratieva E., et al., 2007] и *M. bovis* BCG [Vidal S.M., et al., 1993]. Скорее всего это связано со способностью высоко вирулентных микобактерий *M. tuberculosis* выходить из фагосом и иметь свободный доступ к железу, тогда как менее вирулентные микобактерии остаются в фагосомах и полностью зависят от переноса железа внутрь органеллы. Этот перенос нарушается в результате нонсенс-мутации G169D в гене *Slc11a1*, приводящей к нефункциональности белка [Apt A., 2017].

Переходя к вопросу о генетическом контроле туберкулезной инфекции в экспериментальных моделях, следует сказать, что в результате поиска геномных ассоциаций с чувствительностью к ТБ у инбредных мышей было получено несколько важных результатов. Группа P. Gros провела полногеномный сегрегационный анализ чувствительности к ТБ на мышах F₂, полученных скрещиванием устойчивой и чувствительной родительских линий, соответственно, B6 и DBA/2 [Mitsos L.M., et al., 2000, Mitsos L.M., et al., 2003]. В результате было выявлено 4 локуса, ассоциированных с чувствительностью к ТБ – Tr11, 2, 3 и 4 на хромосомах 1, 3, 7 и 19, соответственно. В другом исследовании рекомбинантных мышей, полученных от скрещивания устойчивой B6 и чувствительной линии СЗН/HeJ (панель мышей ВХН) было обнаружено, что одна из 40 линий (ВХН-2) не контролирует размножение микобактерий *M. bovis* BCG, несмотря на устойчивый генотип *slc11a1* (аллель r). Эта линия также была крайне чувствительна к ТБ, вследствие нарушения ответа по оси IL-12→IFN-γ. У этих мышей развился миело-пролиферативный синдром с преобладающей миграцией незрелых гранулоцитов в лимфоидные органы. Последующий анализ выявил дефект в расположенном на 8-ой хромосоме гене *Icsbp/Irf8* (*IRF8* у человека), регулирующем экспрессию IFN-γ-зависимых генов. Мутация R294C в этом гене приводит к отсутствию иммунного ответа на цитокины 1-ого типа [Turcotte K., et al., 2005, Marquis J.F., et al., 2009].

Важно, что эти результаты позволили идентифицировать похожий синдром у людей. Ученые исследовали одну ирландскую девочку, у которой после

вакцинации развилась ранняя диссеминация BCG. Состав ее крови очень напоминал таковой у мышей BXH-2 и с мутацией *Irf8*^{-/-}. Так была обнаружена мутация K108E в ее гене *IRF8*. Параллельно мутации в этом же гене были обнаружены у двух других пациентов с ранней диссеминацией BCG [Hambleton S., et al., 2011]. Эти работы являются доказательством того, что мутации в генах ортологов у мышей и людей приводят к сходным иммунным нарушениям, но пенетрантность зависит от каждой конкретной мутации.

Еще один ген, отвечающий за чувствительность к ТБ, был обнаружен группой И. Крамника. Исследователи анализировали панель генов других рекомбинантов, полученных путем скрещивания устойчивых мышей B6 и чувствительных C3HeB/FeJ. Результатом этой работы стало определение локуса *sst1* на хромосоме 1 с последующей идентификацией гена *Ipr1* (Intracellular pathogen resistance 1), ответственного за проявление всех основных фенотипов ТБ. Ген *Ipr1* экспрессируется только в макрофагах, а соответствующий белок Ifi75 (IFN-induced protein 75) локализуется в ядре, связывается с хроматином и отвечает за активацию макрофагов [Kramnik I., 2000, Pan H., et al., 2005]. Ближайший гомолог этого гена у людей – SP110b. Недавно было показано, что эти гены влияют на активность NF-κB в макрофагах, что приводит к снижению продукции TNF-α и увеличению экспрессии NF-κB-зависимых генов, подавляющих апоптоз. Таким образом, *Ipr1*/SP110 у инфицированных мышей и больных ТБ может играть важную роль, изменяя цепь ответов в пути NFκB1→TNF-α [Leu J.-S., et al., 2017]. Длительное воздействие TNF-α на макрофаги *sst1*^s, инфицированные микобактериями, приводит к развитию интегрированной стрессовой реакции, и «застреванию» клеток в состоянии стресса и активации путей интерферонов 1 типа, что в результате приводит к некрозу макрофагов [Bhattacharya B., et al., 2021]. Недавно также было проведено исследование, в котором телята с трансгенным устойчивым аллелем мышинового гена *Ipr1* (r) оказались более устойчивы к *M. bovis*, чем их однопометники без подобной вставки [Wang Y.S., et al., 2015]. Кроме того, в одной из последних работ показано, что еще один ген из локуса *sst1* *sp140* тоже играет важную роль в ответе на туберкулезную инфекцию. Дело в том, что *sp140*

активируется цитокином IFN- γ , что приводит к последующему подавлению интерферонов 1 типа [Ji D.X., et al., 2021], негативно влияющих на развитие ТБ.

Наконец, участие еще одного гена в чувствительности к ТБ было недавно показано в нашей лаборатории. Множество работ на мышах и людях описывает очевидное влияние полиморфизмов генов *MHC* на тяжесть течения туберкулезной инфекции [Wu F., et al., 2013, Wamala D., et al., 2016, Harishankar M., et al., 2018]. Однако конкретные аллельные варианты, отвечающие за чувствительность или устойчивость, сложно определить в силу высокого полиморфизма генов в локусе *H2*, а также из-за большого количества различных иммунологически активных генов внутри него. Кроме того, генетический нокаут генов *MHC* классов I и II тоже представляется малоинформативным в силу того, что у таких животных нарушены почти все функции адаптивного иммунитета. Тем не менее, в нашей лаборатории методами прямой генетики в результате скрещиваний устойчивой и чувствительной линий мышей, B6 и I/St, соответственно, было недавно показано, что классический ген *H2-A β* класса II контролирует устойчивость к ТБ [Logunova N., et al., 2015]. Т-клетки CD4⁺ распознают микобактериальные антигены в контексте молекул H2-A β^b более эффективно, чем в контексте молекул H2-A β^j , и продуцируют больше основного противотуберкулезного цитокина IFN- γ . Вследствие этого мыши лучше контролируют размножение микобактерий в органах и дольше живут после заражения.

Таким образом с помощью методов прямой генетики выявляются локусы QTL (quantitative trait loci), контролирующие различные проявления ТБ – кахексию и продолжительность жизни, размножение бактерий в органах и развитие некроза [Kramnik I., et al., 2000 Lavebratt C., et al., 1999, Logunova N., et al., 2015, Mitsos L.M., et al., 2003].

Стоит отметить, что большую часть исследований ТБ проводят на мышах линий C57BL/6 (далее B6) и BALB/C, сравнительно устойчивых к этой инфекции. Отсюда вытекает множество претензий научного сообщества к несостоятельности модели ТБ на мышах, поскольку у таких животных не образуются подобные человеческим очаги некроза. В то же время существует довольно значительная

разница в чувствительности к ТБ среди других лабораторных линий мышей, таких как CBA, DBA/2, A/J, C3H, SWR и даже аутбредных мышей, некоторые из которых значительно более чувствительны к инфицированию микобактериями, чем B6 и BALB/C [подробно описаны в обзоре Kramnik I., Beamer G., 2016]. У таких мышей развивается обширное воспаление и некротические очаги в легких после аэрозольного заражения микобактериями [Turner O.C., et al., 2003]. В целом, у перечисленных линий мышей наблюдаются разные проявления некроза – это некроз макрофагов в разной степени, некротизирующие гранулемы, окруженные фиброзной капсулой, туберкулезная пневмония с внутри-альвеолярным нейтрофильным экссудатом и тромбозом альвеолярных капилляров. Похожие реакции некроза наблюдаются и у людей, и у более крупных модельных животных – кроликов и приматов. Еще одна линия мышей, высокочувствительных к ТБ – это используемые в нашей лаборатории мыши линии I/St. У них в легких образуются некротические гранулемы с зонами гипоксии, которые принято считать признаком патологии легких людей, но не мышей [Radaeva T.V., et al., 2008; Kondratieva E., et al., 2010]. Подобных очагов не наблюдается у устойчивых к ТБ мышей B6, при заражении вирулентными лабораторными штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и Erdman. Однако если взять высоковирулентные, клинические штаммы микобактерий, то даже у мышей линии B6 развиваются некротические очаги при аэрозольном заражении [Guirado E., et al., 2006A].

При этом мыши B6 считаются хорошей моделью для изучения *M. avium*, поскольку инфицирование этими микобактериями вызывает образование в легких некротических гранулем похожих на человеческие [Ehlers S., et al., 2001]. Кроме того, в нашей лаборатории было показано, что чувствительные к ТБ мыши I/St генетически устойчивы к *M. avium*. У них не образуются некротические гранулемы сходные по структуре с человеческими, в отличие от мышей B6 [Kondratieva E., et al., 2007]. За проявление такого фенотипа отвечает описанный выше ген *Slc11a1*, чувствительный s и устойчивый r аллель которого несут мыши B6 и I/St, соответственно.

Помимо некроза, есть также и другие сходные черты в развитии легочной патологии людей и мышей при ТБ. Во многих работах, в том числе в нашей лаборатории, показано, что в легких пациентов с ТБ [Ulrichs T., et al., 2004], а также у зараженных животных вблизи гранулем образуются В-клеточные фолликулы, напоминающие фолликулы вторичных лимфоидных органов [Tsai M.C., et al., 2006, Radaeva T.V., et al., 2008, Yan B.S., et al., 2006, Kondratieva E., et al., 2010, Linge I., et al., 2016]. Кроме того, при сравнительном исследовании пациентов с вторичным ТБ и мышей с реактивацией ТБ (модель Cornell) показаны сходные черты в легочной патологии, в частности развитие липидной пневмонии [Hunter R.L., et al., 2007]. Таким образом, стоит принимать во внимание весь спектр особенностей генетических вариаций для корректного сравнения патогенеза в разных видах и учитывать, что уровень генетической восприимчивости к инфекции определяет степень и характер легочной патологии. Хотя не все особенности течения ТБ можно изучать в моделях на мышах (например, образование каверн), тем не менее множество аспектов его проявления поддается такому анализу.

2.2. Нейтрофилы при микобактериальных инфекциях

Микобактерии туберкулеза попадают в организм воздушно-капельным путем при вдыхании микрокапель мокроты, содержащих бактерии. В легких они поглощаются альвеолярными макрофагами (АМ) [Russell D.G., 2001]. После этого АМ, содержащие микобактерии, мигрируют в интерстициальную ткань легкого. АМ высвобождают такие про-воспалительные факторы, как TNF- α , IL-6, IL-1 α и IL-1 β [Law K., et al., 1996], что привлекает в легкое другие фагоциты: макрофаги CD64⁺CD11c⁺МНСII⁺, нейтрофилы и, в меньшей степени, дендритные клетки и интерстициальные макрофаги, которые захватывают высвобождающиеся из АМ микобактерии, что приводит к их диссеминации в другие клетки иммунной системы [Cohen S.B., et al., 2018]. Затем микобактерии и микобактериальные антигены внутри фагоцитов мигрируют в регионарные лимфоузлы (ЛУ), где происходит презентация антигенов микобактерий Т-лимфоцитам и активируется ветвь адаптивного иммунного ответа.

Нейтрофилы – коротко живущие лейкоциты, которые среди первых мигрируют в ответ на проникновение микобактерий в легкие, быстро попадают в очаг инфекции и поглощают патоген. У больных активным легочным ТБ нейтрофилы обнаруживаются в мокроте и бронхоальвеолярной жидкости (БАЛ) [Eum S.Y., et al., 2010] и являются основными фагоцитами, содержащими микобактерии. В одном из исследований, проведенных в эндемичном районе Африки, было показано, что у больных активным ТБ в крови значительно больше нейтрофилов, чем у здоровых контактов или людей с латентным ТБ (оценка по положительной туберкулиновой пробе TST+). 6-месячное лечение инфекции приводило к снижению числа нейтрофилов до уровня, характерного для латентных носителей [Sutherland J. S., et al., 2009]. В недавней работе также показано, что при туберкулезном плеврите накопление нейтрофилов в плевральной полости ассоциировано с высоким уровнем маркеров воспаления в сыворотке крови, а также с более частым обнаружением микобактерий в плевральной жидкости [Choi H., et al., 2016]. При этом нейтрофилы, по-видимому, не обладают достаточными бактерицидными свойствами, т.е. они фагоцитируют, но не всегда эффективно убивают микобактерии (см. ниже). Таким образом, нейтрофилы могут выступать в качестве «тройского коня», экранируя бактерии от более эффективно убивающих их макрофагов [Eruslanov E., et al., 2005].

2.2.1. Двойственная роль нейтрофилов. Pro et contra

Нейтрофилы являются активными участниками воспаления на всех стадиях развития инфекционного процесса. Взаимодействие микобактерий с нейтрофилами и запуск последующих реакций происходит при участии множества рецепторов на их поверхности. Это толл-подобные рецепторы (TLRs), лектиновые рецепторы (C-type lectins receptors (CLRs)) и рецепторы к цитокинам [Futosi, et al., 2013; Deffert C., et al., 2014; Mayadas T.N., et al., 2014; Stamm C.E., et al., 2015; Lyadova I., 2017]. Нейтрофилы выделяют множество про-воспалительных медиаторов, а также взаимодействуют с другими клетками иммунной системы, влияя на развитие воспалительного процесса. В зависимости от активности притока

нейтрофилов, времени их персистенции в начальной или хронической стадии инфекции, а также степени дифференцировки, их роль в воспалительном процессе может отличаться.

Многие исследования показывают, что роль нейтрофилов при ТБ неоднозначна. В части работ описывается их защитная роль. В частности, было показано, что накопление нейтрофилов у людей, контактировавших с больными ТБ, являлось фактором протекции, поскольку продуцируемые нейтрофилами пептиды кателицидин LL-37 и липокалин 2 сдерживают рост бактерий [Martineau A.R., et al., 2007]. Другой пример защитной роли нейтрофилов был продемонстрирован в модели ТБ на крысах. LPS-индуцированный приток нейтрофилов в значительной степени блокировал образование у них легочных гранул. При этом сами нейтрофилы, активированные LPS *in vivo*, напрямую или опосредованно убивали микобактерии *in vitro* [Sugawara I., et al., 2004]. В моделях на мышах и *Danio rerio* было показано, что нейтрофилы способствуют миграции дендритных клеток [Blomgran R., Ernst J.D., 2011] и оказывают протекцию от микобактерий за счет окислительных реакций [Yang C.T., et al., 2012]. Кроме того, предполагалось, что нейтрофилы взаимодействуют с макрофагами и способствуют лучшему контролю инфекции благодаря продукции цитокинов и содержимого специфических гранул, которые, в свою очередь, активируют оба типа клеток и привлекают новые фагоциты [Yang C.T., et al., 2012, Tan V.H., et al., 2006]. Наконец, в одном из последних исследований показано, что нейтрофилы высвобождают внеклеточные везикулы, способствующие межклеточным взаимодействиям с последующей продукцией супероксид-аниона. Это приводит к повышению экспрессии в макрофагах ассоциированного с аутофагией маркера LC3-II, локализация которого совпадает с микобактериями внутри клеток. Последующее увеличение уровня аутофагии зараженных макрофагов приводит к подавлению роста бактерий внутри них [Alvarez-Jimenez V.D., et al., 2018]. Таким образом, довольно значительная часть исследований демонстрируют защитную роль нейтрофилов.

С другой стороны, о патогенетическом влиянии нейтрофилов свидетельствуют многие данные, полученные в экспериментальных моделях ТБ на животных. Уровень нейтрофильного воспаления зависит от устойчивости к ТБ используемых линий мышей, а также от вирулентности бактерий. Большая часть исследований ТБ в модели на мышах проведены на относительно резистентной линии В6. Иммунный ответ, легочная патология, состав гранулем, формирующихся при аэрозольном заражении таких животных, не похожи на то, что происходит у человека. Это вполне объяснимо: поскольку заболевают именно чувствительные, а не устойчивые к ТБ люди, поэтому резистентных животных нельзя считать оптимальной моделью для изучения нейтрофильного воспаления при ТБ. У мышей В6 наблюдается лишь небольшой приток нейтрофилов в легкие на ранних сроках после инфицирования, по сравнению с чувствительными мышами [Kondratieva E., et al., 2010]. Удаление нейтрофилов у таких мышей непосредственно перед заражением [Seiler P., et al., 2000, Yermeev V., et al., 2015] или в острой фазе [Scott N.R., et al., 2020] не влияет на количество бактерий и патологию легких. Примечательно, что если для заражения использовать более вирулентный для мышей штамм микобактерий *M. tuberculosis* Erdman или клинический гипер-вирулентный изолят HN878, то даже у мышей В6 уровень инфильтрации нейтрофилов в легких повышается и образуются подобные человеческим гранулемы [Choreño-Parra J., et al., 2019].

Совсем другая картина наблюдается у чувствительных к микобактериям животных. Например, инфицирование высокочувствительных к ТБ мышей линии I/St приводит к избыточному притоку нейтрофилов в легкие, что влечет за собой быструю гибель животных [Eguslanov E.V., et al., 2005]. Нейтрофилы многих других чувствительных к ТБ линий мышей образуют некротические очаги внутри гранулем [Kondratieva E., et al., 2010; Marzo E., et al., 2014; Yermeev V., et al., 2015, Keller C., et al., 2006, Driver E., et al., 2012], выделяя при распаде множество факторов, привлекающих в область воспаления новые клетки, которые замещают здоровую ткань легкого.

Многие исследователи считают, что именно нейтрофилы являются участниками терминальной стадии развития инфекции, приводя к распаду ткани легкого [Dorhoi A., et al., 2013, Gopal R., et al., 2013; Nandi B., et al., 2011]. В пользу этой теории свидетельствует исследование, в котором даже мыши устойчивой линии В6 с выключенным в нейтрофилах и моноцитах геном *atg5*, контролирующим процесс аутофагии, умирают уже через 30-40 дней после заражения *M. tuberculosis* от избыточного притока нейтрофилов в легкие и увеличения размеров очагов поражения [Kimmey J.M., et al., 2015; Castillo E.F., et al., 2012].

2.2.2. Факторы, регулирующие миграцию нейтрофилов

Множество хемокинов, цитокинов и других белковых молекул привлекают нейтрофилы в инфицированное легкое. Эти аттрактанты производятся различными эпителиальными, эндотелиальными и иммунокомпетентными клетками, а также самими нейтрофилами, таким образом образуя петлю положительной обратной связи. Среди этих молекул CXCL1, CXCL2, CXCL5, TNF- α и G/GM-CSF, активирующие и способствующие дифференцировке, созреванию и миграции нейтрофилов, а также IL-1 β , G/GM-CSF и IL-3, которые необходимы для выживания нейтрофилов и созревания их гранул [Witko-Sarsat V., et al., 2000; Summers C., et al., 2010, Silva M., et al., 2010, Ueda Y., et al., 2009]. В модели ТБ на мышах показано, что некоторые лиганды хемокиновых рецепторов CCR1 (CCL3, CCL4, CCL5 и CCL7), CXCR1 и CXCR2 (CXCL1, CXCL2, CXCL3 и CXCL5) повышают экспрессию в ответ на туберкулезную инфекцию, что способствует притоку нейтрофилов [Nouailles G., et al., 2014]. В той же работе показано, что TLR2-зависимая продукция CXCL5 эпителиальными клетками легкого стимулирует приток нейтрофилов и деструкцию ткани легкого, тогда как выключение генов для CXCR2 или CXCL5 приводит к уменьшению патологии легких инфицированных животных. Niazi с соавторами показали на аутбредных мышах, что тяжесть течения ТБ ассоциирована с накоплением нейтрофилов и формированием некротических очагов [Niazi M., et al., 2015]. При этом было

установлено, что уровень некроза нейтрофилов в легких прямо коррелирует с уровнем продукции привлекающего нейтрофилы хемокина CXCL1. В недавнем исследовании Scott N.R. с коллегами (2020) показали, что уровень CXCL1 и CXCL10 в крови больных активным ТБ выше, чем у здоровых доноров, что также указывает на роль этих хемокинов в патогенезе ТБ.

При активном туберкулезе в легких преобладают нейтрофилы и некротизирующие макрофаги, продуцирующие белок кальпротектин S100 [Gopal R., et al., 2013], член семейства молекул DAMP (damage-associated molecular pattern). Уровень белков S100A8/A9 в сыворотке крови больных активным ТБ прямо коррелирует со степенью развития воспаления в легких и тяжестью течения болезни [Gopal R., et al., 2013]. Продуцируемый нейтрофилами S100A8/A9, снижается уже через 2 недели после лечения пациентов правильно подобранными антибиотиками, и вновь повышается после реактивации микобактерий. Кроме того, по последним данным уровень мРНК S100A8 и S100A9 в крови пациентов с латентным ТБ значимо повышается примерно за 6 месяцев до диагностики прогрессирующего ТБ, по сравнению со здоровыми людьми или теми, у кого не развился активный ТБ [Scott N.R., et al., 2020]. Гетеродимер белков S100A8/A9 является аутокринным регулятором. Так, Gopal с соавторами показали, что цитокин IL-17 способствует накоплению нейтрофилов, продуцирующих S100A8/A9, которые в свою очередь индуцируют приток нейтрофилов и моноцитов посредством активации продукции провоспалительных хемокинов и цитокинов [Ryckman C., et al., 2003, Sunahori K., et al., 2006]. Кроме того, S100A8/A9 влияет на уровень экспрессии интегрина CD11b, необходимого для накопления нейтрофилов в легких [Scott N.R., et al., 2020]. Показано, что генетический нокаут S100A9 у мышей B6 приводит к лучшему контролю микобактериальной инфекции в хронической стадии и снижает степень реактивации ТБ [Scott N.R., et al., 2020]. В связи с этим S100A8/A9 может служить потенциальным маркером тяжести течения инфекционного процесса при ТБ, а также маркером реактивации ТБ [Gopal R., et al., 2013, Scott N.R., et al., 2020].

Во многочисленных работах с использованием модели ТБ на мышах с нокаут-мутациями по разным иммунологически активным генам показано участие соответствующих белков в регуляции нейтрофильного воспаления. В частности, в отсутствие цитокина IL-18, необходимого для формирования IFN γ -продуцирующих Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, у мышей развивается усиленное воспаление в легких, сопровождающееся увеличенным притоком нейтрофилов и повышенной экспрессией цитокинов IL-6, IL-17, CXCL1, CXCL2, CCL2 и CCL3 в сыворотке и легочной ткани [Schneider B. E., et al., 2010]. У мышей без сигнальной молекулы CARD9, проводящей сигнал от разных PRRs (Pattern Recognition Receptors), наблюдается повышенный уровень воспалительных факторов CCL2, CXCL1 и G-CSF и увеличенный приток нейтрофилов в легкие [Dorhoi A., et al., 2010]. В отсутствие MIF (Macrophage migration inhibitory factor), производимого макрофагами, лимфоцитами и легочными эпителиальными клетками, также развивается более тяжелое течение инфекционного процесса с увеличенным количеством нейтрофилов и уровнем CXCL2 и G-CSF [Das R., et al., 2013]. У мышей ВМС с нокаутом гена рецептора для IFN- γ в эпителиальных и эндотелиальных клетках неконтролируемый рост микобактерий в легких сопровождается массивным притоком нейтрофилов и повышенной экспрессией CCL3, CXCL2, CXCL5, IL-1 β и MMP-9 [Desvignes L. and J. D. Ernst, 2009].

Таким образом, большое количество цитокинов, хемокинов и других молекул прямо или опосредовано влияют на приток нейтрофилов в зараженное легкое.

2.2.3. Взаимодействие нейтрофилов с другими клетками и воспаление при туберкулезе

Нейтрофилы производят множество цитокинов и хемокинов, воздействующих на окружающие клетки и влияющих на развитие иммунного ответа. В частности, они секретируют IL-1 α , CXCL1/КС, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , GM-CSF, металлопротеиназы (MMPs) и другие активные молекулы [Petrofsky M., et al., 1999, Riedel D. D. and Kaufmann S. H., 1997, Sawant K. V and McMurray D. N., 2007].

Выделяемые нейтрофилами CXCL1 и CXCL8 – основные хемокины, привлекающие их самих [Strieter R.M., et al., 1992; Bazzoni F., et al., 1991, Jin L., et al., 2014, Shea-Donohue T., et al., 2008, Wengner A.M., et al., 2008]. IL-1 β и TNF- α также привлекают новые нейтрофилы в область воспаления и активируют их, способствуя дегрануляции, развитию кислородного взрыва и стимулируя секреторную активность [Stek C., 2018]. Одна из ключевых ролей IL-1 β – индукция высвобождения эйкозаноидов, простагландина E2 (PGE2) и лейкотриена B4 (LTB4), нейтрофилами и макрофагами. Эйкозаноиды – важные липидные медиаторы воспаления, быстро синтезируемые фагоцитами при туберкулезной инфекции и привлекающие новые нейтрофилы в область воспаления. Кроме того, LTB4 стимулирует фагоцитоз и бактерицидную активность нейтрофилов. Этот механизм основан на взаимодействии нейтрофилов с микобактериями посредством TLR, активирующим NF- κ B, что опять-таки приводит к экспрессии в нейтрофилах генов воспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α [Kroon E.E., et al., 2018].

Считается также, что нейтрофилы являются вспомогательным источником IFN- γ . Его синтез стимулируется IL-12 либо непосредственно, либо в сочетании с другими стимулами – LPS, IL-2, IL-18 и IL-15 [Ethuin F., et al., 2004]. Показано, что у больных легочным ТБ патология ассоциирована с нейтрофилами, продуцирующими IFN- γ и интерфероны 1-ого типа. При этом, в клетках крови меняются сигнальные пути, инициированные IFN- γ и интерферонами 1-ого типа нейтрофильного происхождения [Berry M.P.R., et al., 2010]. IFN 1-ого типа способствуют прогрессированию заболевания, тогда как IFN- γ может быстро стимулировать уничтожение микобактерий [Ellison M.A., et al., 2017].

Как уже отмечено выше, нейтрофилы одними из первых проникают в легкое после инфицирования микобактериями и быстро накапливаются там. Пик накопления инфицированных нейтрофилов предшествует пику накопления инфицированных дендритных клеток (ДК) в легких мышей [Wolf A. J., et al., 2007]. Показано, что нейтрофилы усиливают миграцию ДК в лимфоузлы, а также доставляют бактерии для вторичного фагоцитоза другим фагоцитам, способствуя более эффективной презентации микобактериальных антигенов лимфоцитам CD4⁺

[R.Blomgranand, J.D.Ernst, 2011]. Так, имеются данные, что при внутрикожном введении BCG, нейтрофилы фагоцитируют микобактерии и доставляют их в дренирующие ЛУ [Abadie V., et al., 2005]. В другой работе было показано, что удаление нейтрофилов при иммунизации мышей модифицированной вакциной mc2-CMX (*M. smegmatis*, продуцирующая белки Ag85c, MPT51 и HspX *M. tuberculosis*), нарушало формирование специфического Th1-зависимого ответа, а также ухудшало контроль инфекции при последующем заражении [Trentini M. M., et al., 2016]. В модели инфицирования микобактериями *M. bovis* BCG на мышцах с дефицитом аттрактанта нейтрофилов IL-17 также показано снижение специфической продукции IFN- γ и нарушение первоначального формирования гранулем [Umemura M., et al., 2007]. Таким образом, на ранней стадии развития иммунного ответа нейтрофилы прямо или опосредованно способствуют активации Т-лимфоцитов CD4⁺ и могут играть роль в образовании гранулем.

2.2.4. Воздействие нейтрофилов на микобактерии

Нейтрофилы напрямую или опосредованно воздействуют на микобактерии, используя различные окислительные и неокислительные реакции. Фагоцитоз микобактерий нейтрофилами провоцирует их дегрануляцию. В результате из нейтрофильных гранул высвобождаются различные протеазы (в том числе эластаза, катепсин G, протеаза 3), гидролазы, антимикробные пептиды и оксиданты – компоненты так называемого «кислородного взрыва» [Condliffe A.M., et al., 1996; Dapino P., et al., 1993; Detmers P.A., et al., 1990; Liles W., et al., 1995; Miralda I., et al., 2017; Nathan C.F., et al., 1987; Neufert C., et al., 2001; Wright H.L., et al., 2013; Corleis B., et al., 2012]. Стоит отметить, что высвобождающиеся агенты действуют не только на микобактерии, но и на клетки окружающей ткани. В частности, оксиданты приводят к разрушению ткани за счет активации различных металлопротеиназ [Nathan C., et al., 2002; Weiss S.J., et al., 1989]. Нейтрофилы также производят активные формы азота и кислорода [Mayadas T. N., et al., 2014]. Выделяемые активные формы кислорода (АФК/ROS) способствуют развитию некроза нейтрофилов. Блокирование АФК приводит к остановке развития некроза

и эффероцитозу зараженных нейтрофилов макрофагами, что имеет защитный эффект при ТБ [Dallenga T., et al., 2017]. H_2O_2 – пероксид водорода, один из компонентов кислородного взрыва. Показано, что сам H_2O_2 слабо действует на микобактерии [Voskuil M.I., et al., 2011], однако образование этих молекул способствует миграции нейтрофилов и пролонгирует воспаление ткани [Nathan C., et al., 2013]. Кроме того, показано, что АФК влияют на NF- κ B [Mitra S., et al., 2006; Warnatsch A., et al., 2017], с последующей индукцией выработки IL-1 β и IL-8 (схс18). АФК также способствуют секреции TNF- α , MIP-2 и нетозу, выбросу нейтрофильных ловушек NETs (Neutrophil Extracellular Traps) [Deffert C., et al., 2014].

Роль нетоза при ТБ исследована недостаточно подробно, но установлено, что NETs образуются при непосредственном воздействии микобактерий [Francis R.J., et al., 2014]. В одной из последних работ продемонстрировано, что микобактериальные белки PE/PPE вызывают образование нейтрофильных ловушек при инкубации с нейтрофилами крови человека *in vitro* [Garcia-Bengoia M., 2023]. Предполагается, что NETs способствуют физическому задержанию микобактерий и ограничивают их распространение в другие органы, а также создают барьер для токсических веществ [Braian C., et al., 2013]. Выброс NETs нейтрофилами способствует концентрации антимикробных факторов, например, эластазы и миелопероксидазы нейтрофилов [Brinkmann V., et al., 2004, Parayannopoulos V., Zychlinsky A., 2009]. NETs также могут влиять на иммунный ответ, активируя макрофаги и дендритные клетки, а также взаимодействовать с компонентами системы комплемента и антителами, способствуя таким образом распознаванию и элиминации патогенов. Вместе с тем, стоит понимать, что образование слишком массивных структур нейтрофильных ловушек может провоцировать чрезмерное воспаление и приводить к повреждению ткани легкого [Narasaraju T., et al., 2020; Hahn J., et al., 201]. Так NETs, индуцированные взаимодействием с микобактериями, стимулируют макрофаги к высвобождению воспалительных цитокинов IL-6, TNF- α и IL-1 β , привлекающих в этот участок больше нейтрофилов [Cavalcante-Silva, et al., 2023]. Кроме того, показано, что в легких больных ТБ

образование NETs ассоциировано с высвобождением NF-κB зависимой матриксной металлопротеиназы MMP8, действие которой приводит к деградации легочного коллагена [Ong C.W., et al., 2015].

Гранулы нейтрофилов могут сливаться с фаголизосомами с высвобождением антимикробных пептидов (АМП). На сегодняшний день у человека обнаружено 3 группы АМП: дефензины, кателицидины и гистатины [Bals R., et al., 2000; Ganz T., et al., 2003; Zanetti M., et al., 2004]. Эти короткие положительно-заряженные молекулы проникают в бактериальные клетки, связываются с мембраной, образуя поры и каналы или выстилая ее изнутри, и образуют комплексы с ДНК и РНК, в результате чего бактерии умирают.

α-Дефензины содержатся в азурофильных гранулах. Однако вирулентные микобактерии успешно блокируют слияние фагосом с такими гранулами, вследствие чего их эффект ограничен [N'Diaye E.N., et al., 1998]. Если же азурофильные гранулы апоптотических нейтрофилов попадают в макрофаги, это способствует подавлению роста микобактерий в макрофагах [Jena P., et al., 2012]. Для некоторых дефензинов показано прямое действие на микобактерии. NHP-1 (Human neutrophil peptide 1) подавляет рост *M. tuberculosis* в культуре и внутри макрофагов *in vivo* и *in vitro* [Sharma S., et al., 1999; Sharma S., et al., 2000; Sharma S., et al., 2001]. Азуроцидин лишь частично подавляет рост *M. tuberculosis* в культуре [Jena P., et al., 2012]. Для катепсинов показан ингибирующий эффект только для *M. bovis* BCG [Steinwede K., et al., 2012]. Специфические гранулы нейтрофилов содержат белок кателицидин. Попадание микобактерий в нейтрофилы приводит к отщеплению протеиназой 3 С-терминального пептида кателицидина LL-37 [Rivas-Santiago B., et al., 2008], который подавляет рост микобактерий в нейтрофилах [Martineau A.R., et al., 2007]. Показано также, что описанный выше цитоплазматический белок нейтрофилов кальпротектин S100A8/A9, вырабатываемый в ответ на туберкулезную инфекцию, ограничивает рост микобактерий, связывая свободный цинк [Jena P., et al., 2012].

Таким образом, хотя эволюционно нейтрофилы имеют множество механизмов воздействия на патоген, микобактерии не очень чувствительны к этим

реакциям, по-видимому, благодаря формированию множества защитных механизмов, позволяющих бактериям выживать внутри этих клеток.

2.2.5. Апоптоз или некроз?

Фагоцитоз микобактерий нейтрофилами приводит к смерти нейтрофилов путем развития апоптоза или некроза. Многие исследования четко демонстрируют, что развитие апоптоза или некроза связано с вирулентностью микобактерий, а блокирование апоптоза нейтрофилов микобактериями способствует их выживанию [DeLeo F.R., et al., 2004, Velmurugan, K., et al., 2007, Blomgran, R., et al., 2012]. В случае смерти нейтрофилов по некротическому пути параллельной гибели микобактерий не происходит [Lowe D.M., et al., 2018]. Более того, макрофаги, поглощающие некротизированные нейтрофилы, содержащие микобактерии, также неэффективно подавляют рост последних [Dallenga T., et al., 2016; Dallenga T., et al., 2017]. Развитию некроза способствуют выделяемые нейтрофилами АФК. Если же их заблокировать, то нейтрофил гибнет по пути апоптоза. При фагоцитозе непосредственно бактерий или бактерий, опсонизированных компонентом или антителами, в нейтрофилах запускается программа фагоцитоз-индуцированной клеточной смерти, PICD (phagocytosis-induced cell death), необходимой для очистки организма от погибающих клеток путем последующего эффероцитоза [Kobayashi S.D., DeLeo F.R., 2009, McCracken J.M., Allen L.A., 2014]. Вследствие этого микобактерии остаются инкапсулированными в апоптотических гранулах и не препятствуют слиянию и созреванию фагосом и лизосом макрофагов после эффероцитоза [Dallenga T., et al., 2016]. Такие макрофаги полноценно справляются с бактериями и убивают их.

В опытах *in vitro* показано, что добавление некротических нейтрофилов к клеткам крови способствует метаболизму микобактерий, а также повышенной продукции противовоспалительного цитокина IL-10, ростовых факторов G-CSF и GM-CSF, а также хемокина CCL2 – аттрактанта моноцитов [Lowe D.M., et al., 2018]. Основная функция этих молекул – привлечение в очаг новых клеток. G-CSF поддерживает рост и размножение предшественников нейтрофилов в костном

мозге [Nicola N.A., et al., 1983], а GM-CSF действует на ранние предшественники нейтрофилов и моноцитов и их незрелые формы [Metcalf D., 1986]. Кроме того, G-CSF и GM-CSF могут опосредовано действовать на функции и фенотип нейтрофилов [Bober L.A., et al., 1995; Höglund M., et al., 1997; Lopez A.F., et al., 1986; Spiekermann K., et al., 1997; Weisbart R.H, et al., 1995], замедляя развитие апоптоза, а также усиливая окислительные реакции, приводящие к разрушению легочной ткани. Важно отметить, что в случае индукции микобактериями некроза, в область воспаления привлекаются все новые и новые клетки, также погибающие некрозом и высвобождающие все больше медиаторов воспаления и разрушения ткани, что в результате и приводит к гибели [Lowe D.M., et al., 2013].

Суммируя вышесказанное, нейтрофилы, одними из первых мигрирующие в область попадания патогена и начинающегося воспалительного процесса, часто не справляются с микобактериями. Запуская каскад реакций, направленных против микобактерий, но малоэффективных, они привлекают новые клетки в область воспаления. Таким образом забивается дышащая ткань, что параллельно способствует разрушению окружающей ткани легкого. В случае развития PICD и апоптоза, нейтрофилы подвергаются эффероцитозу макрофагами и подавлению инфекции. Важно, что при развитии апоптоза в нейтрофилах параллельно снижается экспрессия воспалительных факторов [Kobayashi S.D., et al., 2003], что способствует резолуции общего воспаления.

2.3. В-лимфоциты при микобактериальных инфекциях

Роль В-лимфоцитов и антител при туберкулезе до сих пор до конца не определена. Как уже отмечено, образование гранулем характерно для ТБ. Гранулема состоит из содержащих микобактерии макрофагов, окруженных разными типами иммунных клеток. В-лимфоциты также проникают в инфицированную ткань легкого и образуют там В-фолликулы вблизи гранулем. Образование таких структур показано у людей [Ulrichs T., et al., 2005, Ulrichs T., et al., 2004], а также в экспериментальных моделях ТБ на мышях [Kondratieva E., et al., 2010, Linge I., et al., 2016, Gonzalez-juarrero M., et al., 2001, Slight S.R., et al.,

2013] и макаках [Phuah J.Y., et al., 2012]. Расположение В-фолликулов в непосредственной близости от гранул рождает вопрос об участии В-клеток в формировании иммунного ответа против микобактерий. В-лимфоциты не только выполняют свою основную функцию – обеспечивают образование антител – но могут также секретировать различные цитокины и хемокины и презентировать антигены Т-лимфоцитам, воздействуя таким образом на окружающие клетки и развитие иммунного ответа. Однако несмотря на возросший в последнее время интерес к роли В-клеток при туберкулезе, в этом вопросе остается много неясного.

2.3.1. Свидетельства участия В-лимфоцитов в иммунном ответе при туберкулезе

Доказано, что В-лимфоциты принимают участие в защите против различных внутриклеточных патогенов, таких как лейшмании (*Leishmania spp.*) [Gibson-Corley K.N., et al. 2010, 2014], *Toxoplasma gondii* [Kang H., et al., 2000], сальмонеллы [Wahid R., et al., 2012], *Coxiella burnetii* [Peng M., et al. 2014], *Brucella abortus* [Gomez G., et al., 2013; Hoffmann and Houle 1995; Winter A.J., et al. 1989]. Существуют свидетельства участия В-лимфоцитов и в ответе на туберкулезную инфекцию. Так, например, пик заболеваемости туберкулезом у детей совпадает со снижением общего количества антител в крови в том возрасте, когда ребенок уже не получает антитела с молоком матери, а своя иммунная система еще полностью не запущена [Cruz A.T., Starke J.R., 2007, Donald P.R., et al., 2010]. При этом данные относительно изменения содержания В-клеток у взрослых больных довольно противоречивы. В некоторых исследованиях описано снижение числа В-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с легочным ТБ [Corominas M., et al., 2004, Hernandez J., et al., 2010, Joosten S.A., et al., 2016, Chowdhury R., et al., 2018] и у латентных носителей [Chowdhury R., et al., 2018], по сравнению со здоровыми донорами. Однако в других исследованиях либо не обнаружено какой-либо разницы [Barcelos W., et al., 2006, Chowdhury R., et al., 2018, La Manna M.P., et al., 2022], или даже показано увеличение количества В-клеток в периферической крови больных ТБ [Wu Y., et al., 2009, Кноринг Б.Е., и др., 2019]. Вероятно, такие

различия обусловлены разницей между группами сравнения: неодинаковый возраст пациентов, этническая принадлежность, стадия и форма заболевания и т.д.

Роль В-клеток при ТБ изучается в разных моделях заболевания, и результаты этих исследований опять-таки выглядят неоднозначно. Показано, что аэрозольное инфицирование мышей, не имеющих В-клеток (В-cell (μMT) KO mice), приводит к усиленному нейтрофильному воспалению в легких на ранних стадиях после инфицирования, к нарушению формирования гранулем, а также к укороченному сроку жизни [Maglione PJ, 2007]. Однако в исследованиях, проведенных на мышах дикого типа CBA и дефектных по В-лимфоцитам мышах CBA/N-xid, была отмечена одинаковая чувствительность к первичному заражению штаммами микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv [Nikonenko V.V., et al., 1996] и Erdman [Junqueira-Kipnis A.P., et al., 2005].

Довольно сложно оценить, в какой степени разница в количестве В-клеток между больными ТБ и здоровыми донорами отражает причину или следствие развития инфекции. Даже в опытах с удалением В-лимфоцитов результаты неоднозначны. Так, в инфицированных туберкулезом макаках, удаление В-клеток с помощью ритуксимаба до или в первые моменты после инфицирования приводило к увеличению числа бактерий в органах и снижало уровень продукции цитокинов IL-6 и IL-10 лишь у части животных и никак не влияло на других [Phuah J.Y., et al., 2016]. При этом лечение артрита с помощью ритуксимаба не приводит к увеличению риска реактивации туберкулеза [Liao T.L., et al., 2016, Atzeni F., et al., 2016]. Представляется вероятным, что В-лимфоциты играют разную роль в начале развития инфекционного процесса и на его продвинутой фазе, поэтому удаление В-лимфоцитов на разных стадия развития туберкулеза, приводит к разным последствиям.

2.3.2. Фенотип В-лимфоцитов при туберкулезе

Популяцию В-лимфоцитов подразделяют на несколько субпопуляций, в зависимости от происхождения, поверхностного фенотипа и выполняемых ими

функций. Пул периферических В-клеток включает субпопуляции В-1, В-2 (фолликулярные) и клетки маргинальной зоны МЗ [Hardy R.R., Hayakawa K., 2001].

Исследования больных ТБ выявили динамические изменения в В-клеточных популяциях. Так, в одном из больших исследований было показано, что количество атипичных клеток $IgD^-CD21^-CD27^-$ и активированных В-лимфоцитов IgD^-CD27^+ повышено в крови пациентов с активным или латентным ТБ по сравнению со здоровыми донорами. При этом число наивных лимфоцитов IgD^+CD27^- было, наоборот, снижено в обеих группах с ТБ. Кроме того, было показано, что атипичные В-лимфоциты хуже пролиферируют и продуцируют антитела, а также секретируют меньше цитокинов IL-6 и IL-10 [Joosten S.A., et al., 2016]. Эти результаты хорошо соотносятся с данными, полученными при сравнении популяций В-лимфоцитов у больных активным ТБ и больных с другими легочными заболеваниями. Количество клеток маргинальной зоны, не переключенных на производство того или иного класса антител, зрелых В-клеток, а также клеток памяти IgD^+CD27^+ было снижено у больных ТБ [du Plessis W.J., et al., 2016]. В исследовании больных ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) так же было показано снижение количества В-клеток памяти IgD^+CD27^+ и плазматических клеток [Abreu M.T., et al., 2014]. Вероятно, туберкулезная инфекция каким-то образом подавляет или истощает пул В-лимфоцитов, аналогично тому, что наблюдается у ВИЧ-инфицированных людей в отношении Т-лимфоцитов [Moir S., et al., 2008], хотя о сходстве механизмов здесь говорить не приходится.

Имеются данные, что у пациентов с ТБ увеличено количество В-лимфоцитов с фенотипом $CD19^+CD1d^+CD5^+$, способных подавлять Т-лимфоциты Th17, но не Th1 [Zhang M., et al., 2012]. Кроме того, недавно было показано, что при ТБ появляется экспрессирующая FAS-лиганд популяция В-лимфоцитов, размер которой увеличивается после эффективной противотуберкулезной терапии [Rensburg I.C., et al, 2017A, B]. При этом в плевральной полости латентных носителей количество $FASL^+IL5RA^+$ В-клеток снижено, по сравнению с больными

активным ТБ [Rensburg I.C., Loxton A.G., 2018], что может свидетельствовать о регуляторной функции В-лимфоцитов при туберкулезе (см. следующий раздел).

2.3.3. Взаимодействие В-лимфоцитов с другими клетками

В-лимфоциты, инфильтрирующие легочную ткань, могут взаимодействовать и влиять на окружающие их клетки, либо через контакты, либо посредством секретируемых цитокинов и хемокинов.

Взаимодействие с макрофагами. Макрофаги играют двойную роль при ТБ. С одной стороны, макрофаги – это ключевые клетки, убивающие микобактерии. С другой стороны, фагосомы макрофагов – это основное место размножения микобактерий, по крайней мере на ранних стадиях развития инфекционного процесса [Pandey A.K., Sasseti C.M., 2008; Orme I.M., et al., 2014].

Макрофаги могут поляризоваться по про- или противовоспалительному пути (M1 и M2, соответственно) в зависимости от внешних стимулов [Lugo-villarino G., et al., 2013]. Про-воспалительные цитокины 1 типа (одним из важнейших среди них является IFN- γ) запускают развитие макрофагов по типу M1 [Murray and Wynn 2011a]. Одним из основных физиологических маркеров клеток M1 является фермент индуцибельная NO-синтаза iNOS, необходимая для синтеза соединений активного азота (RNO) и уничтожения внутриклеточных микобактерий [Chan E.D., et al., 2001, Jamaati H., et al., 2017]. Кроме того, клетки M1 продуцируют множество воспалительных факторов, таких как IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, CXCL10, RANTES/CCL5, цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α и т.д. Под действием этих молекул привлекаются нейтрофилы, дендритные клетки, Т-лимфоциты и продолжается архитектурная организация гранулемы. С другой стороны, накопление таких клеток может приводить к разрушению окружающих тканей, т.к. макрофаги M1 продуцируют и множество протеолитических ферментов [Benoit M., et al., 2008; Murray P.J., Wynn T.A., 2011B].

Развитие по пути M2 запускается в результате воздействия цитокинов типа 2, таких как IL-10 и IL-4 [Lugo-Villarino G., et al., 2013]. Поляризация в этом направлении сопровождается выработкой фермента аргиназы-1 (ARG1), что

приводит к блокированию синтеза NO и подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов за счет деградации свободного аргинина [Munder M., et al., 1998]. Макрофаги M2 подавляют воспаление, хуже фагоцитируют антигены и менее эффективны при борьбе с туберкулезной инфекцией [Martinez F.O., et al., 2009]. Судя по всему, экспрессия генов макрофагов, определяющих дифференцировку по типу M1 или M2, пластична и макрофаги M1 могут превращаться в M2 и наоборот в ответ на внешние сигналы и изменение окружения [Murray P.J., Wynn T.A., 2011A].

Показано, что макрофаги M1 и M2 по-разному влияют на развитие легочной патологии при ТБ [Martinez F.O., et al., 2008, Gordon S., Taylor P.R., 2005], а В-лимфоциты, в свою очередь, могут оказывать влияние на направление поляризации макрофагов. Во многих работах продемонстрировано, что лимфоциты В1 направляют дифференцировку макрофагов по пути M2 *in vitro* и *in vivo*. Совместное культивирование перитонеальных лимфоцитов В1 с макрофагами приводило к снижению экспрессии генов провоспалительных факторов TNF- α , IL-1 β и CCL3, повышению экспрессии генов противовоспалительного цитокина IL-10, интерферона 1 типа IFN- β и маркеров макрофагов M2 Ym1 и Fizz [Wong S.-C., et al., 2010]. Показано также, что В1-клетки стимулируют слияние перитонеальных макрофагов с образованием многоядерных клеток *in vivo* [Bogdan C.S.B., et al., 2005]. Это может быть механизмом регулирования подобного процесса в легких. При ТБ макрофаги в легких могут преобразовываться в пенистые макрофаги, содержащие большое количество жиров, и сливаться в гигантские многоядерные клетки. Вероятно, такие макрофаги играют центральную роль в поддержании и реактивации микобактерий [Russell D.G., 2009, Helming L., Gordon S., 2007]. Существует не прямое подтверждение этой гипотезы. Было показано, что из легких мышей CBA выделяется значительно больше пенистых макрофагов, по сравнению с мышами CBA/N, у которых нет лимфоцитов В1 [Junqueira-Kipnis A.P., 2005].

В работе Vénard с соавторами [Vénard A., et al., 2017] также было описано влияние В-лимфоцитов на поляризацию макрофагов. Взаимодействие В-лимфоцитов мышей и людей с микобактериями стимулировало продукцию интерферонов 1-ого типа, поляризующих макрофаги по противовоспалительному

пути M2 *in vitro* и *in vivo*. В костномозговых химерах мышей с В-клетками, в которых был нокаутирован ген для адаптерной молекулы MyD88 (B-MyD88^{-/-}), отмечалась повышенная продукция интерферонов 1-го типа, а в легких после заражения ТБ обнаруживалось значительно больше макрофагов M2. В согласии с этими экспериментальными данными, В-лимфоциты, выделенные из плевральной полости больных ТБ, продуцировали значительно больше интерферонов 1-го типа, чем клетки крови этих же пациентов или здоровых доноров. Таким образом, В-лимфоциты выполняют регуляторную функцию локально, в месте развития инфекционного процесса (легкие, плевральная полость), где В-лимфоциты контактируют с микобактериями и с другими клетками иммунной системы.

Взаимодействие с нейтрофилами. Как уже отмечено выше, нейтрофилы – неоднозначные участники иммунного ответа против микобактерий. Нейтрофилы фагоцитируют микобактерии и способствуют презентации микобактериальных антигенов дендритными клетками Т-лимфоцитам в начале развития инфекционного процесса [Blomgranand R., Ernst J.D., 2011]. Однако по мере развития инфекционного процесса нейтрофилы способствуют излишнему воспалению и деструкции легочной ткани (подробно описано выше). В-лимфоциты также участвуют в этом сложном процессе.

В работах, проведенных на мышах без В-лимфоцитов (B^{-/-}), показано, что у них наблюдается усиленное нейтрофильное воспаление в легких на ранних сроках после инфицирования ТБ [Maglione et al., 2007]. Кроме того, в нашей лаборатории было показано, что В-лимфоциты тормозят миграцию нейтрофилов в область введения микобактерий, что сказывается на эффективности вакцинации мышей против ТБ вакциной BCG [Kondratieva T.K., et al., 2010]. Позднее Kozakiewicz с коллегами показали, что одним из путей влияния В-лимфоцитов на миграцию нейтрофилов является регуляция лимфоцитов Th17, продуцирующих цитокин IL-17, в свою очередь привлекающий нейтрофилы [Kozakiewicz L., et al., 2013]. Эти данные соответствуют наблюдениями Zhang с коллегами, показавших, что в крови больных ТБ увеличено число В-лимфоцитов, способных супрессировать Т-клетки

Th17, причем этот эффект В-лимфоцитов требует непосредственного контакта В и Т-клеток [Zhang M., et al., 2012].

Взаимодействие с Т-лимфоцитами. Хорошо известно, что Т- и В-лимфоциты взаимодействуют друг с другом в процессе иммунного ответа. В-лимфоциты презентуют антигены Т-клеткам. Молекулярные аспекты этого процесса тщательно изучены [Chen X., Jensen P.E., 2008]. Однако данных о подобном взаимодействии при туберкулезе крайне мало. В одной из работ, проведенных на мышах, лишенных В-клеток, была показана их необходимость, как профессиональных APC, для формирования Т-клеток памяти CD4⁺ [Cauwelaert D. N., et al., 2016].

Важной составляющей В-клеточной популяции являются регуляторные В-клетки, хотя их наличие и функционирование, как отдельной популяции, охарактеризовано недостаточно. Изначально В-лимфоциты с иммуносупрессорными функциями были описаны при аутоиммунных заболеваниях, и их основной характеристикой было производство ингибирующего цитокина IL-10 [Mizoguchi A., et al., 2002, Fillatreau S., et al., 2002, Mauri C., et al., 2003]. Позднее было показано, что такие В-клетки поддерживают функционирование регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), из-за чего и было предложено название «регуляторные В-лимфоциты» [Fillatreau S., et al., 2002, Mauri C., et al., 2003, Flores-Vorja F., et al., 2013, Carter N.A., et al., 2011]. До сих пор не найдено каких-либо уникальных показателей, позволяющих выделить эту группу В-клеток в отдельную популяцию ни по происхождению [Rosser E.C., et al., 2016], ни по наличию каких-то специфических транскрипционных факторов, как случае Treg [Rudensky A.Y., et al., 2011], ни по поверхностным маркерам [Catalán D, et al., 2021]. На сегодняшний момент в литературе часто говорят не о В-регуляторных клетках, а о В-клетках, выполняющих регуляторные функции, и таких популяций несколько. Дополнительно выделяют В-клетки, осуществляющие регуляцию за счет секреции цитокинов IL-35 и TGF-β. В последнее время накопилось достаточно данных, о регуляторных функциях за счет связи лигандов PDL1 и FASL на поверхности В-клетки с PD1 и FAS, соответственно, на поверхности различных Т-

лимфоцитов, НК-клеток, других типов В-клеток, макрофагов [Catalán D, et al., 2021].

Так и в работах, посвященных ТБ, описаны В-лимфоциты с супрессорными функциями. В частности, были описаны В-лимфоциты, подавляющие антиген-специфическую продукцию ИЛ-22 мононуклеарами периферической крови больных ТБ, которая возвращается к нормальной после эффективного лечения [Zhang M., et al., 2014]. Кроме того, описана популяция В-лимфоцитов, экспрессирующих лиганд FasL, индуцирующий апоптоз. Показано, что количество таких клеток повышается у больных ТБ, и что они, вероятно, участвуют в контроле туберкулезной инфекции [van Rensburg I.C., 2017A]. Позднее было обнаружено, что В-лимфоциты FasL/IL-5R⁺ и CD24/CD38⁺ с регуляторными функциями присутствуют у больных с активным и латентным ТБ, и их количество увеличивается при повторной стимуляции BCG у последних [van Rensburg I.C., Loxton A.G., 2018, Loxton A.G., van Rensburg I.C., 2021]. Однако прямого свидетельства участия этих клеток в защитном ответе против ТБ пока нет.

2.3.4. В-клеточные фолликулы

Формирование В-клеточных фолликулов (BCFs, B-cell follicles) – это характерная черта многих заболеваний, сопровождающихся воспалением. Показано, что различные вирусные инфекции, такие как вирус гриппа [Moignon-Quiroz J.E., et al., 2004], модифицированный вирус коровьей оспы [Halle S., et al., 2009, Fleige H., et al., 2014], мышинный гамма-вирус герпеса [Kocks J.R., et al., 2009], а также различные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [Fleige H., et al., 2014], микобактерии и грибы *Pneumocystis* [Eddens T., et al., 2017], вызывающие легочные инфекции, способствуют образованию там BCFs. Кроме того, формирование BCFs было описано при неспецифической интерстициальной пневмонии [Peng M., et al., 2017], аутоиммунных заболеваниях и при онкологических заболеваниях [Jones G.W., Jones S.A., 2015, Pitzalis C., et al., 2014]. Образующиеся в легких BCFs обладают всеми чертами В-фолликулов вторичных лимфоидных органов. Так, в их состав входят фолликулярные Т-хелперы Tfh CD4⁺CXCR5⁺, фолликулярные

дендритные клетки (fDC), вены высокого эндотелия, и показано формирование зародышевых центров (Рис.1) [Kahnert A., et al., 2007, Maglione P.J., 2007, Slight S.R., 2013]. Как уже отмечено выше, туберкулезное воспаление в легких вызывает появление BCFs у людей, а также в экспериментальных моделях этого заболевания на мышах и макаках [Tsai M.C., et al., 2006, Ulrichs T., et al., 2004, Slight S.R., et al., 2013, Gonzalez-juarrero M., et al., 2001, Turner J., et al., 2001].

Формирование BCFs зависит от разных молекулярных факторов. С использованием мышей с генетическим нокаутом гена *Cxcr5* показано, что такие мыши более чувствительны к ТБ вследствие нарушения локализации клеток Tfh CD4⁺CXCR5⁺ в паренхиме легкого и последующего взаимодействия с макрофагами. Кроме того, в этой же работе показано, что лимфоциты Tfh CXCR5⁺ важны для формирования BCFs в легких [Slight S.R., et al., 2013]. С использованием мышей-нокаутов с выключенными генами различных цитокинов, хемокинов или рецепторов к ним было также показано, что для формирования BCFs необходимы CXCL13 и CCR7, способствующие проведению сигнала от CCL19 и CCL21 [Kahnert A., et al., 2007]. Кроме того, описана важность цитокинов IL-6 [Kahnert A., et al., 2007, Slight S.R., et al., 2013, Jones G.W., Jones S.A., 2015], IL-17 [Zhang M., et al., 2011], IL-22 [Pitzalis C., et al., 2014, Turner J., et al., 2001], IL-23 и рецептора к IL-17 – IL-17R [Khader S.A., et al., 2011] (Рис.1). Вышеописанное свидетельствует о том, что структуры BCFs в легких при ТБ во многом зависят от тех же факторов, что и формирование и поддержание В-фолликулов вторичных лимфоидных органов.

Принимая во внимание вышеописанное, можно предположить, что В-лимфоциты и образуемые ими фолликулы, можно рассматривать как дополнительный фактор патологии при ТБ. В работе Slight с соавторами предполагалось, что BCFs являются лишь следствием правильной локализации фолликулярных Т-лимфоцитов в легком, но сами по себе не обязательны для контроля инфекции [Slight S.R., et al., 2013]. В наших экспериментах по инфицированию мышей различных линий микобактериями *Mycobacterium avium* мы показали, что белок Nramp1 (протонная помпа двухвалентных катионов в

фагосомах макрофагов) – основной регулятор чувствительности к *Mycobacterium avium*. Мыши линий B6 (Nramp1^S) и I/St (Nramp1^F) обладают зеркальным фенотипом чувствительности к *Mycobacterium avium* и *M. tuberculosis*: мыши линии B6 чувствительны к *M. avium* и устойчивы к *M. tuberculosis*, а мыши линии I/St наоборот [Kondratieva E. V., et al., 2007]. При этом большее количество BCFs образуется именно у мышей чувствительных к инфекции *M. avium* [Kondratieva E., et al., 2010].

В вышеупомянутой работе Slight с соавторами показано, что при ТБ фолликулярные Т-лимфоциты Tfh CXCR5⁺, локализованные именно внутри BCFs, производят про-воспалительные цитокины и активируют макрофаги, что необходимо для протекции [Slight S.R., et al., 2013]. В легком с нарушенной организацией В-фолликулов наблюдается неправильное расположение этих Т-лимфоцитов, что ведет к неоптимальной стимуляции макрофагов и, как следствие, к худшему контролю туберкулезной инфекции [Slight S.R., et al., 2013]. Кроме того, в модели ТБ на приматах формирование BCFs, содержащих лимфоциты Tfh CXCR5⁺, ассоциировано с лучшей протекцией, а у больных ТБ – со сдерживанием инфекции [Zhang M., et al., 2011]. В связи с этим, сложно однозначно ответить на вопрос, всегда ли В-фолликулы являются фактором патогенеза, или могут участвовать в протекции при ТБ.

2.3.5. Цитокины, продуцируемые В-лимфоцитами

В последнее время накопилось множество данных о роли цитокинов, производимых В-клетками, при различных внутриклеточных инфекциях [Fillatreau S., et al., 2011, Shen P., et al., 2014, Shen P., Fillatreau S., 2015], что указывает на возможную роль этих факторов при развитии воспаления и патологии при ТБ. Существует свидетельство того, что легочные В-лимфоциты участвуют в регуляции противовоспалительного цитокина IL-10. Описано, что у мышей CBA/N-xid с дефицитом В-клеток, уровень IL-10 в легких повышен по сравнению с контрольными животными, однако механизм такой регуляции пока не известен [Junqueira-Kipnis A.P., et al., 2005]. Вместе с тем, в одной из последних работ

показано, что при введении бактерий BCG в легких увеличивается количество В-лимфоцитов, продуцирующих IL-35 [Chen C., et al., 2020]. Такие клетки обнаруживаются в лёгких и у больных активным ТБ. Кроме того, В-лимфоциты IL-35⁺ периферической крови таких пациентов секретируют и ингибирующий цитокин IL-10 [Dai Y.C., et al., 2019]. Параллельно, в модели ТБ на приматах показано, что легочные В-лимфоциты продуцируют в значительной степени провоспалительные цитокины IL-6 и IL-17, в меньшей степени IL-10 и IFN- γ , и незначительное количество В-лимфоцитов гранулемы продуцируют IL-2 и TNF- α [Phuah J., et al., 2016]. Показано также, что при удалении В-лимфоцитов у заражённых ТБ приматов уровень IL-17 и TNF- α не изменяется, но снижается уровень IL-6 и IL-10, исходя из чего предполагается, что В-лимфоциты вносят значительный вклад в производство этих цитокинов [Phuah J., et al., 2016]. При этом, в крови больных ТБ обнаруживаются атипичные В-клетки со сниженной продукцией IL-6 [Joosten S.A., et al., 2016], но эти данные не противоречат друг другу, поскольку В-лимфоциты разной локализации (легкие и кровь) не обязательно должны быть физиологически одинаковы. В дополнение, в работе Benard с соавторами показано, что одними из основных цитокинов, продуцируемых легочными В-лимфоцитами мышей и В-клетками плевральной полости больных с активным ТБ, являются интерфероны 1-ого типа, поляризующие макрофаги по противовоспалительному пути M2 [Benard A., et al., 2018]. Таким образом за последние годы появилось достаточно свидетельств активного участия В-лимфоцитов в ответе на туберкулезную инфекцию с точки зрения продукции цитокинов. Однако до сегодняшнего времени роль большинства из них не определена.

2.3.6. Антитела и туберкулез

Антитела (АТ) являются важными участниками защитного иммунного ответа против многих внутриклеточных инфекций [Casadevall A., et al., 2006], однако их роль при ТБ остается спорной уже на протяжении многих лет [Schierloh P., et al., 2014, Casadevall A., et al., 2006].

Производство антител при туберкулезной инфекции. В большом количестве работ описаны АТ, продуцируемые при ТБ у людей и животных. В недавнем исследовании на мышах было показано, что перитонеальные лимфоциты B1 CD23⁺CD43⁺ продуцируют большое количество антител IgM в ответ на стимуляцию липидными антигенами *M. tuberculosis* H37Rv или бактерий *M. bovis* BCG *in vitro* [Ordoñez C., et al., 2018]. Показано также, что легочные В-лимфоциты макак производят антитела IgG, специфичные к антигенам культурального фильтрата *M. tuberculosis* [Phuah J.Y., et al., 2012]. В другом исследовании на обезьянах показано, что низкий уровень продукции антител на ранних стадиях после инфицирования ассоциирован с реактивацией латентной инфекции. Авторы предположили, что стресс-индуцированная реактивация ТБ возникает именно у животных, которые не способны быстро производить специфические к микобактериям АТ [Kunnath-Velayudhan S., et al., 2012].

Защитная роль АТ была показана в модели на животных и у больных ТБ. Так, мыши AID(-/-)μS(-/-), у которых полностью отсутствует продукция АТ, хуже контролировали рост микобактерий и умирали раньше по сравнению с контрольными мышами линии B6 [Torrado E., et al., 2013]. Введение иммунной сыворотки от животных, инфицированных *M. tuberculosis*, усиливало противотуберкулезный ответ в легких у мышей, лишенных В-лимфоцитов. Кроме того, была показана роль иммуноглобулинов IgA, основного изотипа представленного на слизистых, в модели вакцинации против ТБ. Интраназальная вакцинация микобактериальным антигеном PstS-1 индуцировала локальную выработку антител IgA и защиту от последующей инфекции у мышей дикого типа по сравнению с мышами pIgR^{-/-}, у которых отсутствует полимерный иммуноглобулиновый рецептор IgR, не способных синтезировать IgA. У мышей pIgR^{-/-} микобактерии быстрее проникали в органы, что сопровождалось сниженным производством про-воспалительных цитокинов IFN-γ и TNF-α в легких на ранней стадии развития заболевания [Tjärnlund A., et al., 2006].

Существуют также проведенные на детях исследования, свидетельствующие об участии АТ в защите от ТБ. В одном из первых было обнаружено, что

наибольшему риску развития диссеминированного ТБ подвергаются дети в возрасте от 6 до 36 месяцев, неспособные продуцировать АТ к липоарабиноманнану (LAM) микобактерий [Costello A.M., et al., 1992]. Похожие результаты были получены для АТ к антигену микобактерий 38-kDa [Bothamley G., et al., 1988]. При этом риск заболевания активным ТБ у детей снижается, если они способны производить АТ специфичные к секретируемому антигену микобактерий Ag85A [Fletcher H.A., et al., 2016]. Кроме того, косвенным свидетельством участия АТ в защите от ТБ можно считать тот факт, что наиболее уязвимый возраст детей – это 2-12 месяцев, когда уровень материнских АТ в крови ребенка заметно снижается [Cruz A.T., Starke J.R., 2007, Donald P.R., et al., 2010]. Одно из недавних исследований показало, что общий титр IgG выше у вакцинированных BCG детей с отрицательным ответом на QuantiFERON-340 TB Gold In-tube test (группа QFT-), чем у детей группы QFT+ [Logan E., et al., 2018], что можно считать свидетельством защитной функции этих иммуноглобулинов.

В последние годы было проведено обширное сравнение АТ взрослых больных активным и латентным ТБ и медицинских работников (группа контакта) в туберкулезной больнице в Пекине. Специфичные к микобактериям АТ были обнаружены во всех исследуемых группах. Однако, лишь АТ латентных носителей и здоровых доноров обладали протективным эффектом *in vitro* и *in vivo*. Такие АТ способствовали снижению числа микобактерий при инкубации цельной крови доноров, а также защищали мышей, которым за 20 часов до аэрозольного заражения вводили эти АТ [Li H., et al., 2017]. В этой работе показано, что АТ латентных носителей отличаются уровнем гликозилирования Fc-фрагментов и связываются с рецепторами FcR γ IIIa со значительно более высокой аффинностью. Кроме того, такие АТ активировали образование инфламмасом, созреванию фаголизосом и снижению количества микобактерий при культивации с макрофагами *in vitro* [Lu L.L., et al., 2016]. При исследовании индивидов, находящихся в постоянном контакте с больными ТБ, было выявлено следующее. Часть таких людей имели отрицательную реакцию в тесте TST и IGRA, т.е. их Т-клетки не производили IFN- γ в ответ на стимуляцию антигенами ESAT6/CFP10.

Самое интересное, что у таких людей были выделены АТ, специфичные к микобактериальным антигенам Ag85, ESAT6/CFP10, HspX, GroES и LAM [Lu L.L., et al., 2019]. Такие люди были названы «резисторами», т.е. устойчивыми к развитию ТБ, несмотря на постоянный контакт с больными, и у них преобладали иммуноглобулины подкласса IgG1.

Интересные данные были получены при анализе специфичности сывороточных АТ больных активным ТБ и латентных носителей. С использованием микрочипов, содержащих антигены микобактериального протеома, было показано, что в сыворотке крови больных обнаруживаются АТ, специфичные лишь к 0,5% антигенов всего протеома микобактерий. У больных активным ТБ – это преимущественно АТ, специфичные к секретлируемым антигенам, а у латентных носителей – к антигенам клеточной стенки бактерий, причем их уровень прямо коррелировал с бактериальной нагрузкой у исследуемых пациентов [Kunnath-Velayudhan S., et al., 2010]. В другом исследовании той же группы были проанализированы больные с разным количеством бактерий в мазках и макаки на разных стадиях ТБ (активный, латентный и в стадии реактивации). Уровень анти-микобактериальных АТ значительно различался между группами пациентов и здоровых доноров. У инфицированных животных уровень АТ коррелировал со степенью тяжести болезни: ТБ в активной фазе и в стадии реактивации сопровождался повышенным уровнем АТ, тогда как у животных с латентной инфекцией уровень АТ быстро увеличивался сразу после заражения, а затем постепенно снижался [Kunnath-Velayudhan S., et al., 2012].

Из вышеописанного ясно, что АТ участвуют в защите организма от туберкулезной инфекции, но многие молекулярные механизмы этого ответа мы не знаем.

Пассивная иммунизация. Защитный эффект пассивной иммунизации специфическими к микобактериальным антигенам АТ был показан в нескольких исследованиях. Введение моноклональных АТ (мАТ) специфичных к арабиноманнану и липоарабиноманнану (ЛАМ), основным структурным антигенам клеточной стенки *M. tuberculosis*, способствует локализации бактерий

внутри гранулем [Teitelbaum R., et al., 1998]. Введение мАТ к ЛАМ до или параллельно с внутривенным инфицированием штаммом *M. tuberculosis* Harlingen также приводило к снижению бактериальной нагрузки в легких и селезенке, снижало скорость потери массы тела и увеличивало продолжительность жизни зараженных животных [Hamasur B., et al., 2004]. Аналогичные данные были получены с использованием мАТ против α -кристаллина микобактерий [Reljic R., et al., 2006, Balu S., et al., 2011]. Интраназальное заражение животных микобактериями, предварительно опсонизированными мАТ к гепарин-связывающему гемагглютинирующему адгезину (НВНА), приводило к снижению диссеминации микобактерий в органы, по сравнению с контрольными животными [Pethe K., et al., 2001].

Дополнительное свидетельство участия АТ в иммунном ответе при ТБ было получено с использованием поликлональных сывороток. Например, введение иммунодефицитным мышам SCID, лишенным Т- и В-клеток, сыворотки иммунизированных микобактериальным экстрактом или зараженных иммунокомпетентных мышей частично защищало мышей SCID от реактивации ТБ после лечения изониазидом и рифампицином (снижение количества микобактерий в органах и уменьшение размеров гранулем) [Guirado E., et al., 2006B]. Было также показано, что внутривенное введение высокой дозы иммуноглобулинов от здоровых животных инфицированным мышам на ранних или поздних этапах развития болезни способствовало снижению бактериальной нагрузки в легких и селезенке [Roy E., et al., 2005].

Роль Fc-рецепторов в ответе на ТБ. Роль рецепторов к АТ в ответе на микобактерии сначала была показана в работах *in vitro*. В одной из ранних работ было установлено, что культивирование микобактерий в присутствии кроличьей антисыворотки способствует Fc-ассоциированному фагоцитозу макрофагами. Это приводило к успешному слиянию фагосом с лизосомами и, как следствие, к снижению жизнеспособности бактерий [Armstrong J.A., et al., 1975]. Позднее было показано, что опосредованный рецепторами к комплементу фагоцитоз микобактерий макрофагами человека приводит к снижению концентрации ионов

Ca^{2+} в цитоплазме. Это, в свою очередь, имеет ряд серьезных последствий для разных путей антибактериального ответа, включая образование активных форм азота и кислорода, секрецию микробицидных белков и пептидов и синтез воспалительных цитокинов, в том числе $\text{TNF-}\alpha$ [Chen B.C., et al., 1998, Watanabe N., et al., 1996]. Фагоцитоз опсонизированных микобактерий с участием рецепторов FcR восстанавливает в макрофагах нарушенное проведение сигналов от ионов Ca^{2+} , что приводит к снижению выживаемости бактерий внутри клеток [Malik Z.A., et al., 2000].

Было также показано, что активационные и ингибирующие рецепторы $\text{Fc}\gamma\text{-R}$ по-разному влияют на течение ТБ. Мыши B6-(RIPB-/-) , лишенные ингибирующего рецептора $\text{Fc}\gamma\text{RIPB}$, лучше контролируют микобактериальную инфекцию, чем мыши дикого типа. У этих животных развивается более сильный ответ Th1 , увеличивается количество $\text{IFN-}\gamma$ -продуцирующих Т-клеток CD4^+ , а также усиливается активация антиген-презентирующих клеток (АПК), что выражается в повышенной продукции компонента p40 цитокина IL-12 , необходимого для активации лимфоцитов Th1 . Все вместе это приводит к снижению патологии в легких. Напротив, у мышей, лишенных общей для разных активирующих рецепторов $\text{Fc}\gamma\text{R}$ γ -цепи, наблюдается усиленная иммунопатология, сопровождающаяся увеличенным количеством микобактерий в органах и повышенной продукцией супрессорного цитокина IL-10 [Maglione P.J., et al., 2008]. Подобные данные были получены, при исследовании пациентов с ко-инфекцией ТБ и ВИЧ. Транскрипционный профиль клеток крови таких больных показывает сильно увеличенную экспрессию генов активационного рецептора $\text{FcR}\gamma\text{Ia}$ у пациентов с активным ТБ по сравнению с латентными носителями, независимо от ВИЧ-статуса [Sutherland J.S., et al., 2014]. По-видимому, активирующие и ингибирующие рецепторы $\text{FcR}\gamma$ работают как антагонисты, и точный баланс проводимых от них сигналов необходим для оптимального иммунного ответа и эффективного контроля туберкулезной инфекции [Maglione P.J., et al., 2008].

3. Материалы и методы

Методологической основой данного исследования является положение о неоднозначности действия В-лимфоцитов в отношении внутриклеточных инфекций и неоднозначности действия нейтрофилов в отношении различных видов бактерий. Вместе с тем использование различных линий мышей в качестве модели острого или хронического воспаления при туберкулезной инфекции дает возможность исследовать и решать поставленные задачи.

3.1. Лабораторные животные

Исследования проводили на мышах инбредных линий: C57BL/6Y/Cit (B6), I/StSnEgYCit (I/St), C57BL/6.GFP, C57BL/6IL6^{-/-}, CBA и CBA/N-xid, B6.I-100, B6.I-139. Линии поддерживались братско-сестринскими скрещиваниями в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. В работе были использованы самки в возрасте 2-3 месяцев на момент начала экспериментов.

Мыши C57BL/6CD19^{cre/cre} и C57BL/6IL6^{flox/flox} [Quintana A., et al., 2013], C57BL/6TNF- α ^{flox/flox} были любезно предоставлены профессором С.А. Недоспасовым. Необходимые варианты мышей C57BL6CD19^{cre/-}IL6^{flox/flox} C57BL6CD19^{cre/-}TNF- α ^{flox/flox} с отсутствием экспрессии цитокина IL-6 или TNF- α в В-лимфоцитах, соответственно, были получены путем скрещивания родительских линий (F1=C57BL/6CD19^{cre/cre} x C57BL/6IL6^{flox/flox} / C57BL/6TNF- α ^{flox/flox}; затем F1 x C57BL/6IL6^{flox/flox} / C57BL/6TNF- α ^{flox/flox}) с последующим типированием потомства. В качестве контроля в экспериментах использовали мышей C57BL/6IL6^{flox/flox} и мышей дикого типа B6.

Праймеры для определения трансгенных вставок:

CD19-Cre

CD19.8 5'-AATGTTGTGCTGCCATGCCTC-3'

CD19.9 5'-GTCTGAAGCATTCCACCGGAA-3'

lck2 5'-AATGTTGCTGGATAGTTTTTACTGC-3'

TNF-flox

KO41-3: 5'-TACACAGAAGTTCCCAAATG-3'

KO42-3: 5'-GAAATCTTACCTACGACGTG-3'

IL-6-flox

F: 5'-CCCACCAAGAACGATAGTCA-3'

R1: 5'-GGTATCCTCTGTGAAGTCTCC-3'

R2: 5'-AGCACTTTATTGGGCTCTATACA-3'

IL-6KO

F: 5'-ACCGSTATGAAGTTCCTCTC-3'

R 5'-CCAACCAACCCTACCTAGA-3'.

3.2. Микобактериальные культуры

В работе использовали бактерии *M. tuberculosis* H37Rv (субштамм Pasteur) и штамм *M. avium* 724 из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ», полученные в препаративных количествах и хранившиеся в виде аликвот при -70°C в лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ». Для заражения животных использовали фильтрованную культуру микобактерий. Для этого из аликвот получали культуры микобактерий, находящиеся на стадии логарифмического роста [Nikonenko et al., 2000]. Размороженную культуру *M. tuberculosis* или *M. avium* дважды пассировали при 37°C в жидкой среде Дюбо (Dubos broth, Difco, США), содержащей 0,5% БСА. Каждый цикл продолжался 7 дней. После окончания второго цикла культивирования микобактерии осаждали центрифугированием при $1000\times g$ 15 минут при 4°C , один раз отмывали в среде, дважды в растворе Версена с 1% Tween-80, тщательно ресуспендировали, переводили в раствор PBS с 1% Tween-80 и фильтровали через стерильные фильтры с диаметром пор 5 мкм (Millipore, MA, США) для удаления агрегатов микобактерий («фильтрованная» культура). Для определения концентрации микобактерий в культуре серийные 5-кратные разведения суспензии наносились в виде капель объемом 20 мкл на чашки Петри с агаром Дюбо (Dubos, Difco, США).

После высыхания капель чашки Петри закрывали и инкубировали при 37°C. Через 3-4 суток культивирования выбирали наименьшее разведение с не слившимися микроколониями *M. tuberculosis* или *M. avium* (по результатам микроскопии при увеличении $\times 20$ в инвертированном микроскопе) и подсчитывали не менее 500 микроколоний при суммарной площади просчитанных полей зрения $\geq 5\%$ общей площади высохшей капли. Концентрацию микобактерий в фильтрате выражали числом колониобразующих единиц на мл (КОЕ/мл) и вычисляли по формуле: $N \times (D^2/d^2/n) \times (1000/V) \times F$, где **N** - число просчитанных микроколоний во всех полях зрения, **D** - диаметр высохшей капли разведения в мм, **d** - диаметр поля зрения в мм, **n** - число полей зрения, **V** - исходный объем капли в мкл, **F** - фактор разведения. В наших условиях при **d** = 0,86 мм (определялся объект-микрометром ЛОМО), **n** = 10, **V** = 20 мкл формула упрощалась до **67,57** \times **ND**²**F**.

Исходную суспензию хранили при 4°C в течение всего времени культивирования микроколоний. Хранение культуры при такой температуре в течение 4 дней не влияло на жизнеспособность микобактерий [Nikonenko B. V., et al., 2000].

3.3. Заражение микобактериями

Мышей инфицировали в аэрозольной камере фирмы “GlasCol” при предварительно подобранных условиях, обеспечивающих дозу инфекции 100 КОЕ и 1500 КОЕ/мышь для *M. tuberculosis* [Majorov K., et al., 2003] и *M. avium* [Kondratieva E., et al., 2007], соответственно. В экспериментах с адоптивным переносом костного мозга и клеток эмбриональной печени заражение мышей проводили внутривенно в дозе 5×10^5 КОЕ/мышь.

Вакцинацию мышей осуществляли подкожным введением микобактерий *Mycobacterium bovis* BCG (субштамм Pasteur), 2×10^7 КОЕ/мышь.

3.4. Определение количества микобактерий в органах зараженных животных

На разные сроки после заражения определяли количество микобактерий во внутренних органах. Для этого стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора или высевали из легочного перевара (см. ниже), затем готовили серийные десятикратные разведения и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco, США) по 50 мкл на чашку. Чашки Петри с нанесенными суспензиями инкубировали при 37°C, через 18-20 дней подсчитывали количество макроколоний *M. tuberculosis* или *M. avium* на чашке и пересчитывали их количество на орган (КОЕ/орган) по следующей формуле: $N = N_1 \times P / 0.05$

N – количество колоний в органе;

N_1 – количество колоний на чашке;

P – разведение исходной суспензии.

3.5. Антигены

В качестве антигена в экспериментах использовали соникат *M. tuberculosis* H37Rv, растворимую фракцию разрушенных ультразвуком *M. tuberculosis* H37Rv, или культуральный фильтрат микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv и *M. avium* 724. Антигены были получены и любезно предоставлен для исследований Авдиенко В.Г.

3.6. Среды и растворы

Культивирование клеток проводили в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин (L-Glu), 1 mM пирувата, 1% заменимых аминокислот, антибиотики (100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина), 5×10^{-5} M 2β-меркаптоэтанола (все компоненты NuClone, Голландия). Также в культуральную среду добавляли эмбриональную телячью сыворотку (FCS) (NuClone, Голландия) в различных количествах, в зависимости от того, для каких

целей использовали среду. 5% FCS добавляли в среду для кратковременного культивирования клеток *in vitro*. 2% сыворотки использовали для кратковременного культивирования клеток в присутствии живых микобактерий.

В экспериментах по оценке фагоцитарной активности макрофагов, требующих совместного культивирования макрофагов и живых микобактерий, антибиотики в культуральную среду не вносили.

На этапе выделения органов и получения клеточных суспензий использовали среду Хэнкса (Панеко, Россия), с добавлением 2% сыворотки крупного рогатого скота (BCS, NuClone). В зависимости от целей эксперимента в среду вносили или не вносили антибиотики (100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина).

Перед введением *in vivo* клетки ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS, Sigma-Aldrich, США).

3.7. Получение суспензии клеток легкого

Для получения клеток легкого использовали модифицированную методику Holt и соавт. (Holt et al., 1985; Lyadova et al., 1998). Мышам вводили смертельную дозу тиопентала. Клетки периферической крови из ткани легкого удаляли промыванием сосудов до тех пор, пока ткань легкого не становилась молочно-белого цвета, для чего иглу 10 мл шприца с раствором Версена (PBS, содержащий 1мМ ЭДТА) вводили в правый желудочек сердца. Легочную ткань измельчали ножницами в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей 5% FCS, 10 мМ HEPES (все компоненты NuClone, Голландия), коллагеназу (150 ед/мл, Sigma, США) и ДНКазу (50 ед/мл, Sigma, США), после чего добавляли еще 5 мл на легкое среды для переваривания и инкубировали 1-1,5 часа при 37⁰С. После окончания периода ферментативного расщепления суспензию клеток тщательно пипетировали. Клетки отмывали три раза в среде Хэнкса, содержащей антибиотики и 2% BCS, и переводили в среду культивирования с 5% FCS. Количество жизнеспособных клеток определяли по окраске трипановым синим.

3.8. Получение суспензии клеток регионарных лимфатических узлов

Суспензию клеток лимфатических узлов готовили на льду в стерильных условиях. Лимфатические узлы гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 мкм, клетки дважды отмывали в среде Хэнкса, содержащей антибиотики и 2% BCS, центрифугированием при 300 x g в течение 7 минут и переводили в культуральную среду с 5% FCS. Количество жизнеспособных клеток определяли по окраске трипановым синим.

3.9. Получение суспензии клеток селезенки

Суспензию клеток селезенки готовили на льду в стерильных условиях. Селезенку гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 мкм, клетки осаждали центрифугированием при 300xg в течение 5 минут. Эритроциты удаляли добавлением к осадку клеток лизирующего буфера (смесь 0,83%-ного раствора NH_4Cl и 0,2 М Трис-буфера (pH 7,2) в соотношении 9:1). Осадок ресуспендировали в 2 мл лизирующего буфера и инкубировали в течение 2 минут при комнатной температуре. Затем клетки осаждали и дважды отмывали в отмывочной среде центрифугированием при 300 x g в течение 5 минут. Осадок переводили в культуральную среду, содержащую 5% FCS. Количество жизнеспособных клеток определяли по окраске трипановым синим.

3.10. Получение перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и супернатантов клеток

Для получения перитонеальных макрофагов или нейтрофилов за 5-6 дней или за 16-18 часов до опыта, соответственно, мышам внутрибрюшинно вводили 2 мл 3% пептона (Sigma, США). Клетки перитонеального экссудата выделяли, промывая брюшную полость 5 мл среды Хэнкса (ФГУП ИПВЭ, Россия), содержащей 2% FCS и 10 ед./мл гепарина (ФГУП МЭЗ, Россия). Затем клетки

отмывали от гепарина центрифугированием и ресуспендировали в полной питательной среде RPMI-1640 с 5% FCS, 5 mM HEPES, 2 mM глутамином (здесь и далее все добавки к средам, если не указано иное, HyClone, США). В случае получения макрофагов проводили их адгезию в культуральных чашках (здесь и далее вся пластиковая посуда – Costar, США) в среде RPMI-1640 с 10% FCS в CO₂-инкубаторе (60 мин) для отделения от примеси других типов клеток. Полученный монослой после отмывания не прилипших клеток, отделяли раствором Версена. Для получения нейтрофилов клетки перитонеального экссудата также наносили на чашки для адгезии макрофагов, после чего не прилипшие нейтрофилы собирали и использовали для дальнейших тестов. Жизнеспособность суспендированных клеток оценивалась по окраске трипановым синим (HyClone, США).

Для получения супернатантов клеток, выделенные макрофаги и/или нейтрофилы инкубировали в 24-луночной планшете в количестве 8 млн/мл на лунку в течение 6, 24 или 48 часов в полной питательной среде RPMI-1640 с 5% FCS, 1 mM 5 mM HEPES, 2 mM глутамином, пирувата, 1% заменимых аминокислот, антибиотиков (100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина), 5×10^{-5} M 2-меркаптоэтанола, 37°C, 5% CO₂.

3.11. Получение обогащенных популяций В-лимфоцитов и нейтрофилов

Получение обогащенной популяции В-лимфоцитов проводили методом сортировки с помощью магнитных бус. Выделение В-клеток из суспензии клеток легкого мышей В6 и I/St через 8 недель после заражения проводили позитивной селекцией с помощью кита CD19 MicroBeads (MyltenyBiotech, США). Получение В-клеток селезенки для адоптивного переноса и тестов *in vitro* проводили с помощью негативной селекции при помощи кита MojoSort™ Mouse Pan B Cell Isolation Kit (Biolegend, США). Для обогащения В-лимфоцитов легкого полученную после переваривания суспензию клеток инкубировали в течение 1 часа в культуральной среде, содержащей 10% FCS на обработанных культуральных

чашках (tissue culture treated) для адгезии прилипающей фракции клеток легкого. Затем не прилипшие клетки снимали, отмывали в среде Хэнкса, содержащей 2% FCS, и проводили подсчет для последующего обогащения с помощью соответствующего кита в соответствии с инструкциями производителя.

Получение обогащенной популяции нейтрофилов клеток легкого мышей B6 проводили через 6 недель после заражения методом сортировки на магнитных бусах с помощью кита “Neutrophil Isolation kit” (MyltenyiBiotec, США) в соответствии с инструкциями производителя.

3.12. Гистологическая окраска тканей легкого

Ткань левого лёгкого замораживали в электронном криотоме (ThermoShandon, Великобритания) в градиенте температур -20 -60° C в течение 7 мин. в среде Neg50 (ThermoShandon, Великобритания), после чего оставляли при -20° C на 1 ч. Затем приготавливали срезы толщиной 10-12 мкм вдоль самой широкой части лёгкого. Срезы высушивали на воздухе в течение 1 часа, после чего заворачивали в фольгу и полиэтилен хранили при -20° C до момента использования.

Для выявления патологии криопрепараты легкого окрашивали гематоксилином и эозином. Для этого срезы фиксировали в 96% этаноле. Далее, срезы последовательно обрабатывали 96% этанолом (1 мин), 70% этанолом (1 мин) и 50% этанолом (1 мин), промывали в проточной воде (1мин), окрашивали гематоксилином (1-2 мин), промывали проточной водой (1мин), и помещали в слабый раствор NH_4OH (1мин). Затем промывали проточной водой (1 мин), обрабатывали 70% этанолом (1мин), спиртовым раствором эозина (15-20 сек.), 96% этанолом (3 раза по 1мин) и ксилолом (3 раза по 1 мин). Затем срезы заключали в гистологическую заливку Shandon-Mount (ThermoShandon, Великобритания) под покровные стёкла. Стёкла со срезами высушивали на ровной поверхности и фотографировали с использованием прямого микроскопа Axioskop 40 (Zeiss, Германия) и фотокамеры AxioCam MRc5 (Zeiss, Германия).

Для иммуногистохимической окраски препаратов легкого криосрезы фиксировали в 1% PFA, 10 минут и промывали в PBS (30 мин). Затем препараты инкубировали в блокирующем буфере: PBS, содержащем 10% ослиной сыворотки и 0,25% TritonX100. Затем срезы инкубировали с первичными крысиными АТ против B220 (разведение 1:100) и/или АТ кролика к CD4 или CD3, Ki67, iNOS с последующей докраской ослиными АТ против крысы или кролика, меченными AF488 или Cy3 в течение 30 минут при комнатной температуре (разведение 1:1000). Затем срезы заключали в гистологическую заливку ProLongDiamond Antifade Mountant (ThermoFisher, США), содержащую краситель DAPI для контрастирования ядер клеток. Визуализацию окраски проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axioskop40 (Zeiss, Германия), камеры AxioCam MRc5 и программы AxioVisio 4 (Carl Zeiss, Германия).

3.13. Окраска микобактерий аурамино

На фиксированные макрофаги, содержащие микобактерии, наносили раствор аурамина и оставляли на 20-30 минут при комнатной температуре в темном месте. Затем промывали от краски в PBS, после чего инкубировали в 3% HCl на спирте 2 раза по 2-3 минуты. Затем промывали в PBS и докрасивали монослой клеток гематоксилином.

3.14. Антиген-специфический пролиферативный тест

Постановку пролиферативных тестов проводили в 96-луночных плоскодонных планках [Apt A.S., et al., 1991]. Свежевыделенные клетки подколенных лимфоузлов или готовые Т-линии (1, 2, 3 и 4×10^5 клеток/лунку) культивировали в присутствии АПК (спленоциты – 3×10^5 , макрофаги – 1×10^4) с добавлением антигена (10 мкг/мл сониката H37RV) или бактерий BCG, *M. tuberculosis* H37RV в 0,2 мл полной культуральной среды. В контрольные лунки вносили такое же количество АПК и Т-клеток без антигена. Через 48 часов в культуру добавляли 0,5 мкКи метил- ^3H -тимидина. Через 18 часов содержимое лунок переносили на фильтры из стекловолокна с помощью полуавтоматического

харвестра (Scarton, Норвегия). Включение радиоактивной метки регистрировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике (Wallac, Финляндия).

3.15. Анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии

Определение уровня экспрессии поверхностных маркеров проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Для этого $3-5 \times 10^5$ клеток/пробу осаждали в PBS, содержащем 1% BCS. Для подавления неспецифического связывания антител через Fc-рецепторы к осадку на льду добавляли 25 мкл PBS-BCS, содержащего 0,025 мкг моноклональных антител, специфичных к молекулам CD16/CD32 и инкубировали 5 минут. По окончании времени инкубации в пробы вносили по 25 мкл PBS-BCS, содержащего необходимые меченые моноклональные антитела к поверхностным маркерам (0,025-0,125 мкг антител/пробу): B220-PE, CD19-AF488, CD19-BV510, IgM-AF488, IgD-PE, CD23-AF647, CD21/35-APC, CD43-FITC, CD11b-biot + Str.-PerCP, CD1d-PerCp, CD5-FITC, CD138-PE, CD69-AF488, CD86-PE, МНСII-FITC (IAP), Ly6G-FITC, CD4-PE, CD4-BV421, CD8 α -PerCP, CD44-FITC, CD62L-APC, CXCR5-APC (все антитела производства Biolegend, США). Клетки инкубировали с мечеными антителами в течение 20 минут при +4⁰C, трижды отмывали в PBS-BCS и фиксировали в 1%-ном растворе параформальдегида. Контрольные пробы обрабатывали аналогично опытным, но без добавления меченых антител, а также с добавлением только одного или с исключением одного необходимого АТ (fluorescent minus one, FMO-контроль).

Определение продукции цитокинов оценивали методом внутриклеточного окрашивания с помощью Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, США) в соответствии с методикой производителя. Вкратце, суспензию клеток легкого инкубировали 16-17 ч в присутствии антигенов микобактерий с добавлением реагента GolgiStop на последние 12 ч инкубации. Затем клетки отмывали центрифугированием 2 раза при 300g, 7 минут, проводили окраску поверхностных рецепторов, как описано выше, обрабатывали буфером для фиксации и

пермиабиллизации, после чего проводили окраску мАТ к цитокинам IFN- γ -APC (BDBiosciences), TNF-FITC, IL-6-PE, IL-17-PerCP, IL-21-PE (Biolegend, США).

Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur и FACSCantoII (Beckton Dickinson, San Diego, CA). Анализировали не менее 30×10^3 клеток каждого образца, данные обрабатывали с помощью программ BD-CellQuestPro (Beckton Dickinson) и FlowJo (Tree Star, Inc., San Carlos, CA).

3.16. Выделение суммарной РНК

Для выделения тотальной РНК (для последующего qPCR-анализа) использовали от 1,5 до 5×10^6 суспензии клеток или 2 малые доли правого легкого мыши. Выделение проводили при помощи набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США) в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя.

Клетки промывали 15 мл ледяного стерильного PBS, а затем центрифугировали 5 минут при 300g. К осадку клеток добавляли 175 мкл Lysis Buffer и тщательно разбивали клетки при помощи шприца с диаметром иглы 27G. В случае выделения РНК из ткани легкого, 2 малые доли правого легкого гомогенизировали в 450 мкл Lysis Buffer, после чего лизат немедленно замораживали и хранили при -70°C до последующей работы. К 175 мкл полученного лизата добавляли 350 мкл RNA Dilution Buffer и аккуратно перемешивали 3-4 раза. Полученный раствор инкубировали 3 минуты при 70°C , а затем центрифугировали 10 минут при 14000g. После центрифугирования супернатант, содержащий РНК, переносили в новую 1,5-мл пробирку и добавляли к нему 200 мкл 95% этанола. Данный раствор перемешивали и наносили на колонку. После чего колонку в 1,5-мл пробирке центрифугировали 1 минуту при 14000 x g. Далее колонку промывали 600 мкл RNA Wash Solution и наносили 50 мкл смеси, содержащей 40 мкл Yellow Core Buffer, 5мкл 0,09 M MnCl_2 и 5 мкл DNaseI; инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли DNaseStop solution, после колонку вместе с 1,5-мл пробиркой центрифугировали 1 минуту при 14000 x g, а затем дважды промывали 600 мкл RNA Wash Solution.

Элюцию РНК с колонки проводили 100 мкл DEPC-обработанной воды. Концентрацию полученной РНК определяли спектрофотометрически. РНК хранили до дальнейшего использования при -80°C .

3.17. Получение кДНК

Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию 1-2 мкг тотальной РНК с помощью обратной транскриптазы M-MLV (Promega, США), согласно инструкции производителя. В качестве праймеров использовали oligo(dT)_{15} .

3.18. Определение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

С помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR) оценивали транскрипцию генов цитокинов, хемокинов и транскрипционных факторов в различных субпопуляциях клеток, для чего использовали различные праймеры (см. таблицу). ПЦР анализ экспрессии генов проводился с использованием генов домашнего хозяйства *Hprt* и *Actin* в качестве контроля с постоянным уровнем экспрессии. Анализ проводили на приборе cfx96 (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Реакция ПЦР проходила при следующих условиях:

95°C – 3 мин.	
95°C – 10 с	} 40 циклов
60°C – 10 с	
72°C – 30 с	
95°C – 15 с	
60°C – 60 с	
60°C → (+0,5 ⁰) → 95°C	

3.19. Анализ репертуаров BCR

Для анализа BCR РНК выделяли с помощью набора RNeasy Micro Kit (Qiagen) из очищенных легочных В-лимфоцитов (индивидуально по 5×10^5 от мыши). Использовали 5–10 нг РНК на реакцию синтеза кДНК с использованием

набора для подготовки библиотеки ДНК Nextera XT (Illumina) и 10 циклов ПЦР-амплификации в соответствии с рекомендациями производителя. Репертуары тяжелых цепей BCR были сопоставлены с генами BCR мыши и собраны непосредственно из необработанных данных секвенирования РНК с использованием программного обеспечения MiXCR [Bolotin D. A., et al., 2015]. Метод Беньямини-Хохберга (BH) использовался для коррекции всех значений p для множественных сравнений ($\leq 0,05$). Кластеризация цепей IGH и расчет конвергенции (варианты последовательности нуклеотидов CDR3 на аминокислоту), индекса Шеннона-Винера и показателей разнообразия были выполнены с использованием собственного скрипта Python.

3.20. Удаление нейтрофилов и В-лимфоцитов *in vivo*

Для элиминации нейтрофилов специфические моноклональные антитела анти-Ly-6G-Ly6C (RB6-8C5) вводили мышам CBA/N внутрибрюшинно в количестве 100 мкг/мышь за сутки до вакцинации. Антитела были любезно предоставлены S. Kaufmann (Max Planck Institute, Берлин, Германия). Контрольным мышам CBA/N вводили моноклональные антитела того же изотипа IgG2b против вируса картофеля в том же количестве. Через 15 часов после введения антител проводили проверку эффективности удаления нейтрофилов (~99%) по оценке клеток периферической крови методом проточной цитофлуориметрии с помощью МАТ анти-Ly-6G, 1A8, (BD Pharmingen, США).

Удаление нейтрофилов у мышей I/St и B6 проводили через 2 и 6 дней после аэрозольного заражения введением моноклональных антител 1A8 или изотипического контроля внутрибрюшинно в количестве 150 мкг/мышь. Через 7 дней после заражения проводили контроль удаления нейтрофилов по анализу клеток периферической крови с помощью проточного цитофлуориметра. У мышей, которым инъецировали антитела 1A8, количество нейтрофилов в крови не превышало 10% от количества нейтрофилов у контрольных животных.

Для удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ мышам В6 вводили внутривенно крысиные элиминирующие мАТ ULTRA-Leaf aCD20 (SA271G2, Biolegend, США) по 0,25 мг на мышь через 16 недель после аэрозольного заражения микобактериями *M.tuberculosis* H37Rv (100 КОЕ/мышь), и затем еще дважды с 10и-дневным интервалом. Контроль удаления В-лимфоцитов проводили по окраске клеток периферической крови мАТ против CD19 с последующим анализом на проточном цитофлуориметре, а также по ИГХ окраске криопрепаратов легкого.

3.21. Адоптивный перенос клеток

Для получения радиационных костномозговых химер реципиентов СВА/Н облучали в дозе 9,5 Гр (^{60}Co) и через 6 ч вводили внутривенно клетки костного мозга, свежесыводенные из бедренных костей доноров СВА (перенос от одного донора к одному реципиенту; $15\text{--}20 \times 10^6$ клеток/мышь). Четыре контрольные мыши, не получавшие защитный перенос клеток, погибли на 9–11-е сутки после облучения с признаками острой лучевой болезни костного мозга. Реципиенты отдыхали в течение 6 недель и использовались для экспериментов по вакцинации/инфекции.

Клетки эмбриональной печени мышей СВА выделяли на 17-18-й день эмбрионального развития. Затем 10×10^6 клеток вводили взрослым мышам-реципиентам СВА/Н внутривенно за 4 недели до вакцинации.

Клетки перитонеальной полости мышей СВА полностью или после адгезии прилипающей на пластик фракции вводили в перитонеальную полость мышей СВА/Н в количестве 5×10^6 , через 15 ч после чего вводили бактерии BCG в количестве 10^8 КОЕ/мышь.

Клетки селезенки мышей В6.GFP выделяли через 3 недели после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv (100 КОЕ/мышь). Затем обогащенную фракцию В-лимфоцитов GFP+ вводили мышам В6 дикого типа (зараженным за 3 недели до введения), внутривенно в количестве 5×10^6 /мышь.

3.22. Определение уровня цитокинов и антител методом ELISA

Суспензии клеток легкого или селезенки культивировали в 24х-луночных планшетах с или без добавления антигенов микобактерий (10 мкг/мл) в течение 48 ч, 5% CO₂, 37⁰C. Затем собирали супернатанты клеток и хранили их при -70⁰C до момента проведения реакции ELISA. Определение цитокинов IL-6, IL-10, IL-11, TNF- α , TGF- β и IFN- γ производили методом ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для определения концентрации цитокинов в перитонеальном экссудате, перитонеальную полость мышей СВА или СВА/Н промывали раствором PBS (3 мл PBS + 2 мкл/мл гепарина), через 30 и 90 минут после введения 1 мл раствора PBS, содержащего 10⁸ КОЕ BCG или чистого раствора PBS (контроль). Затем клетки перитонеального экссудата были осаждены центрифугированием, после чего в супернатанте концентрации KC, MIP-2 и G-CSF были определены методом ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) в соответствии с рекомендациями производителя.

Специфические к *M. tuberculosis* антитела определяли количественно с помощью ELISA. Для этого наносили 0,5 мкг на лунку микобактериального культурального фильтрата (CF), растворенного в 1 х PBS (Sigma-Aldrich, США) на дно 96-луночного планшета maxisorp (Thermo Scientific, Дания) на ночь, +4⁰C. Затем лунки блокировали PBS, содержащим 1% BSA (Calbiochem, США), в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови, разведенные до 1:200 в PBS, содержащем 1% BSA, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в качестве детектирующего антитела использовали конъюгированные с HRP козлиные анти-мышинные IgM, IgG, IgG2a и IgG2c (разведение 1:2000) (JacksonImmunoResearch, США). Для обнаружения IgG1 в качестве детектирующего антитела использовали биотинилированный крысиный анти-мышинный IgG1 (клон А85-1) в разведении 1:2000 (1 час при комнатной температуре) с последующей инкубацией со стрептавидином-HRP в течение 20 минут. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность измеряли при 450 нм.

Все промывки проводились с использованием 1xPBS, содержащего 0,05% Tween20.

3.23. Определение количества Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , методом ELISPOT *in vitro*

Количество IFN- γ -продуцирующих клеток в легких интактных и зараженных вакцинированных и не вакцинированных мышей определяли с помощью метода ELISPOT. Связывающие моноклональные антитела к IFN- γ (клон R4-6A2, BD PharMingen, США), разведенные до концентрации 4 мкг/мл в стерильном фосфатном буфере, вносили в лунки 96-луночного планшета (Millipore, MAIP S45, США) в объеме 100 мкл/лунку и инкубировали в течение 18-20 часов при 4⁰С. По окончании периода инкубации содержимое лунок удаляли, вносили по 200 мкл/лунку культуральной среды, содержащей 5% FCS, инкубировали при 37⁰С. Через 2-4 часа удаляли из лунок среду, вносили в них исследуемые клетки в дуплетах в концентрации 0,5-8x10⁵/лунку с антигеном (10 мкг/мл) или без него и инкубировали 48 часов при 37⁰С в 5% CO₂. Планшеты отмывали 5 раз фосфатным буфером по 200 мкл/лунку, один раз дистиллированной водой, вносили биотинилированные проявляющие антитела (клон XMG1.2, BD PharMingen, США) в концентрации 1 мкг/мл в фосфатном буфере и инкубировали 2-4 часа при комнатной температуре. По окончании периода инкубации планшеты отмывали 6 раз фосфатным буфером и добавляли конъюгат щелочной фосфатазы со стрептавидином (Sigma, США), разведенный в фосфатном буфере 1:1000, по 100 мкл/лунку и инкубировали 1-2 часа при комнатной температуре. По окончании инкубации лунки отмывали 6 раз фосфатным буфером и добавляли по 100 мкл субстрата (Sigma), растворенного в фосфатном буфере. Через 5-60 минут реакцию останавливали водой и высушивали планшеты. Количество пятен в лунках подсчитывали с помощью ELISPOT reader (BioReader 4000 Pro-X, BIO-SYS, Германия).

3.24. Получение наивных лимфоцитов и специфических Т-линий

Наивные лимфоциты были выделены из подколенных, подмышечных и брыжеечных лимфоузлов интактных животных методом гомогенизирования. Полученную клеточную суспензию отмывали центрифугированием, переводили в полную питательную среду и использовали в опытах с неспецифической активацией пролиферации лимфоцитов.

Специфические к антигенам микобактерий Т-линии получали по методике, описанной ранее [Pichugin A.V., et al., 1998]. Вкратце, иммунные клетки подколенных лимфатических узлов получали на 14 сутки после подкожной инъекции животным в подушечки лап ультразвукового дезинтеграта микобактерий (сониката) *M. tuberculosis* H37Rv (20 мкг/мышь) в неполном адьюванте Фрейнда. Затем полученные иммунные Т-лимфоциты отмывали в отмывочной среде, переводили в полную культуральную среду и инкубировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в присутствии 10 мкг/мл сониката H37Rv в 24-луночном плоскодонном плейте 10-14 дней при 37°C, 5% CO₂. С помощью инвертированного микроскопа по виду клеток определяли фазу прекращения пролиферации и наступления «фазы отдыха», обычно на 10-12 день. Живые клетки выделяли из собранных культур центрифугированием на градиенте Lympholyte M с плотностью 1,088 г/см³ (Sebarlane, Канада) при 2500 x g (20 мин, 23°C) и дважды отмывали. В следующем цикле стимуляции культивировали 2×10^5 /мл полученных клеток в присутствии АПК ($1,5 \times 10^6$ /мл) селезенки, обработанных митомицином С (Киова, Япония), и сониката H37Rv (10 мкг/мл) в течение 9-11 дней. Такие циклы стимуляции и отдыха повторялись до тех пор, пока клетки либо не погибали, либо не начинали расти как стабильная Т-клеточная линия. Полученные Т-линии замораживали в смеси FCS (90%) и DMSO (10%) и хранили при -140°C до момента использования.

3.25. Неспецифические стимуляторы пролиферации Т-лимфоцитов

Антитела αCD3 (R&D System, США), 5 мкг/мл, предварительно сорбировали в течение ночи при +4°C; конканавалин А (Sigma-Aldrich, США), 2,5 мкг/мл. Все

реакции проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах в полной питательной среде при 37°C, 5% CO₂.

Кроме того, в тестах по изучению влияния «фактора нейтрофилов» на пролиферацию в качестве спонтанно пролиферирующих клеток использовали мышиную миелому SP2/0 (предоставлена В.Г. Авдиенко).

3.26. Блокаторы основных ингибиторов пролиферации

Каждый из блокаторов пролиферации добавляли одновременно с внесением в культуру пролиферирующих клеток и супернатанта нейтрофилов для последующего определения включения [³H]-тимидина. Нейтрализация интерлейкина 10 – антитела αIL-10 (R&D System, США) – 0,1 мкг/мл; нейтрализация трансформирующего ростового фактора β – антитела αTGF-β (R&D System, США) – 3 мкг/мл; блокирование аргиназы – nor-NOHA (Cayman Chemical, США) – 100 мкМ; блокирование простагландинов – индометацин (Sigma-Aldrich, США) – 2мкг/мл.

3.27. Изучение подвижности и взаимовлияния клеток в системе Transwell

Для изучения подвижности нейтрофилов мышей СВА и СВА/Н использовали систему Transwell (Costar, США, поры d=3 μm). Для этого в верхнюю камеру планшета вносили 5 x 10⁵ нейтрофилов перитонеального экссудата, выделенных через 4 ч после введения пептона. В нижнюю камеру вносили или только чистую среду RPMI 1640, или 0,12, 0,6 или 3 x 10⁵ В-клеток перитонеального экссудата без или с добавлением 10⁶ КОЕ BCG на лунку. Через 1 ч клетки извлекали из нижних камер и проводили подсчет нейтрофилов после окраски мечеными МАТ анти-Ly6G и анализа клеток с помощью проточного цитофлуориметра.

Для определения необходимости контакта клеток, а также влияния истощения среды на включение [³H]-тимидина мы использовали систему Transwell с диаметром пор d=0,4 μm. В нижнюю камеру 24-луночного планшета помещали

АПК – спленоциты, обработанные митомицином С (6×10^5 /лунку), специфические Т-линии (5×10^4 /лунку) и соникат Н37Rv (10 мкг/мл). В верхнюю камеру вносили макрофаги, нейтрофилы или спленоциты (все типы клеток по 4×10^5 /лунку). Через 24 часа в нижнюю камеру добавляли 0,5 мкКи [^3H]-тимидина, после чего определяли включение метки в Т-линии, как описано ниже.

3.28. Тест на включение [^3H]-тимидина

Постановку тестов включения тимидина проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах. В культуру исследуемых клеток добавляли 0,5 мкКи метил- [^3H]-тимидина через 24 часа инкубации. Еще через 18 часов содержимое лунок переносили на фильтры из стекловолокна с помощью полуавтоматического харвестра (Scarton, Норвегия). Включение радиоактивной метки регистрировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике (Wallac, Финляндия).

3.29. Определение пролиферации по включению CFSE

Клетки миеломы (10^8) инкубировали в 1 мл PBS с добавлением CFSE ($5 \mu\text{M}$) 8 минут в темноте при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 10 мл холодного PBS. Меченые клетки 2 раза отмывали центрифугированием в PBS, 300g, 7 минут, после чего использовали для анализа пролиферации. Флуоресценцию части клеток анализировали сразу (точка 0 ч), остальные вносили в 24-х луночный планшет (3×10^5 кл./мл/лунку) в полной питательной среде с или без добавления супернатанта нейтрофилов. Оценку пролиферации клеток проводили через 24 и 40 часов по снижению флуоресценции на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD Biosciense, США).

3.30. ВЭЖХ

Супернатанты нейтрофилов подвергали ультрафильтрации на центрифужном фильтре Amicon Ultra-4 (мембрана 10кДа), ультрафильтрат наносили на хроматографическую колонку Symmetry 300C4 5 μm (4,6x250mm) с

помощью петли 1мл и проводили разделение компонентов с помощью линейного градиента от 0 до 60% подвижной фазы Б за 15 минут со скоростью протока 1мл/мин. Подвижная фаза А – 0,1% ТФУ (HPLC grade, Sigma-Aldrich, США) в воде (milli-Q с удельным сопротивлением не менее 18 МОМ/см). Подвижная фаза Б – ацетонитрил (gradient grade for HPLC, Merck, Германия). Детектирование осуществляли при длинах волн 280 нм и 214 нм. Температура 20°C. Фракции отбирали вручную через каждые 2 мин. Каждую фракцию высушивали на центрифужном концентраторе (30°C), разводили в полной культуральной среде и проверяли на биологическую активность ингибирования включения тимидина. Фракцию, имеющую биологическую активность, подвергали хроматографии на вышеуказанной колонке в градиенте от 10% до 30% подвижной фазы Б за 15 мин. Разделённые фракции собирали через 60с и проверяли биологическую активность. Активную фракцию дополнительно очищали на колонке Symmetry C₁₈ 5µm (4,6x250mm) в изократическом режиме 4% фазы Б и 96% фазы А. Чистоту очищенного соединения проверяли на колонке Symmetry C₁₈ 5µm (4,6x250mm) в вышеуказанных изократических условиях. Собранную активную фракцию анализировали с помощью масс-спектрометрического метода ESI-TOF (ионизация распылением в электрическом поле, времяпролетная масспектрометрия).

3.31. ЯМР

Спектры ЯМР измеряли на спектрометре Bruker Avance 600 MHz (Германия), оснащённом 5 мм датчиком ТХ1 и системой импульсных градиентов магнитного поля. Хроматографическую фракцию 3.1.1 «фактора нейтрофилов» замораживали и лиофилизировали для удаления воды и ацетонитрила. Сухое вещество в количестве ~15 мкг растворяли в 320 мкл D₂O с высоким содержанием дейтерия (99.99%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., США) и переносили в ампулу Shigemi с магнитной восприимчивостью, соответствующей D₂O. Для установления строения исследуемого вещества измеряли спектры DQF COSY (протон-протонная корреляционная спектроскопия с двухквантовой фильтрацией) и ¹³C-¹H HSQC

(гетероядерная корреляционная спектроскопия с одноквантовым переносом когерентности).

3.32. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью метода Стьюдента (t-тест), корреляционного и вариационного анализа (ANOVA) с Tukey пост-тестом. Сравнение выживаемости животных проводили с использованием критерия Гехана или Log-rank теста. Достоверными считали различия при $P < 0,05$. Полученные данные обрабатывали с помощью программ GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) и Excel.

4. Результаты

4.1. Нейтрофилы при микобактериальных инфекциях

4.1.1 Удаление нейтрофилов снижает тяжесть течения ТБ

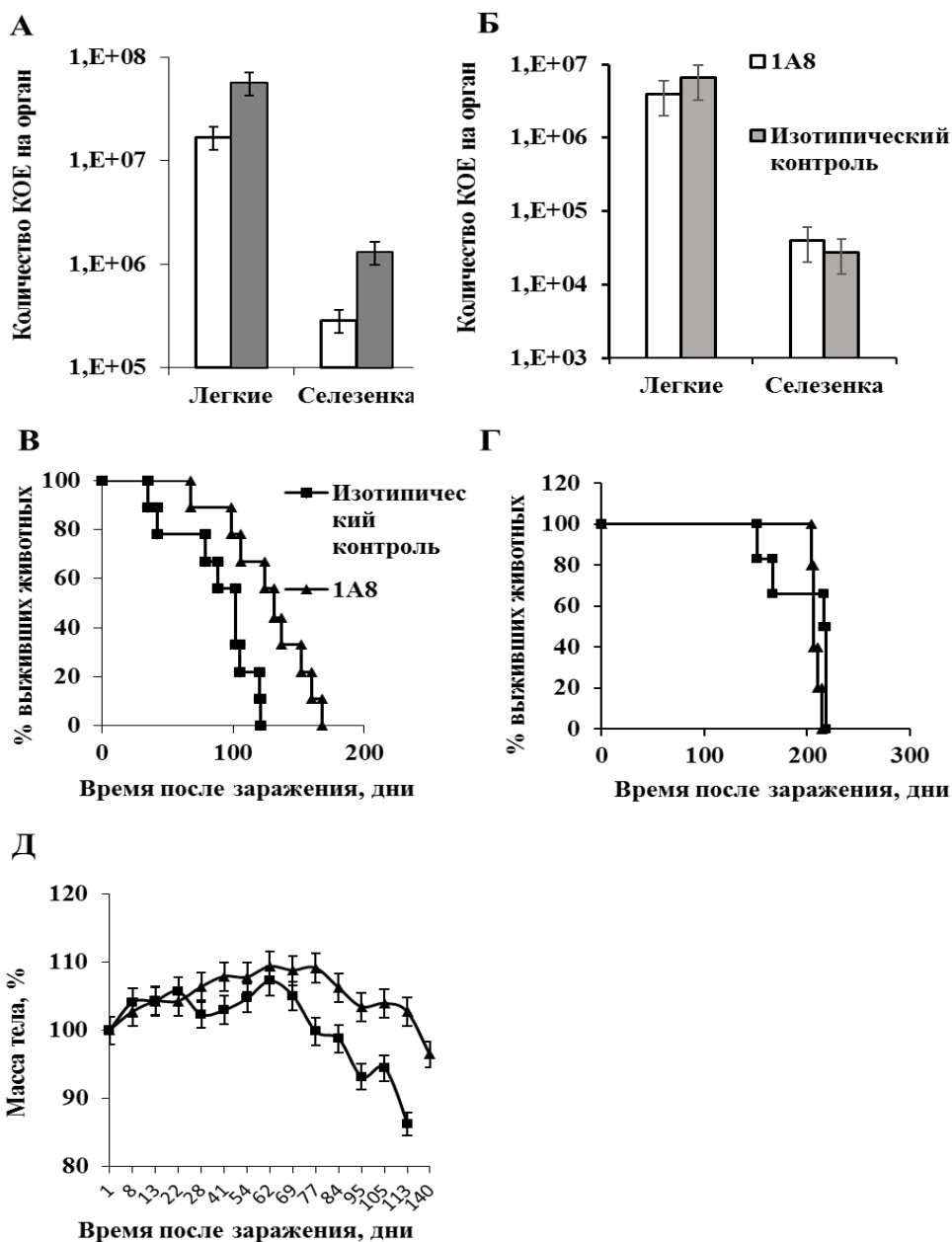
Ранее в нашей лаборатории было показано, что нейтрофильное воспаление в легких проявляется сильнее у генетически чувствительной к ТБ линии мышей I/St по сравнению с устойчивыми линиями A/Sn [Nikonenko V.V., et al., 2000; Eruslanov E., et al., 2005] и B6 [Kondratieva E., et al., 2010]. При инфекции в легких чувствительных мышей образуются некротические очаги в местах скопления нейтрофилов. Нейтрофилы производят множество действующих на окружающие клетки цитокинов и хемокинов, а также различные противомикробные пептиды [Soehnlein O., et al., 2008A, Soehnlein O., et al., 2008B, Soehnlein O., et al., 2009]. Фагоцитарная активность нейтрофилов сопоставима с макрофагами и выражена сильнее у чувствительных мышей I/St по сравнению с устойчивыми. Однако в отличие от макрофагов, нейтрофилы исследованных линий мышей почти не убивают *M. tuberculosis*, даже при стимуляции экзогенным IFN- γ . Было высказано предположение, что нейтрофилы выступают в качестве «Троянского коня», экранируя микобактерии от макрофагов, и, одновременно, служат фактором патогенеза, индуцируя излишнее воспаление [Eruslanov E., et al., 2005].

В развитие этих результатов мы решили проверить, снизится ли тяжесть туберкулезного процесса, если элиминировать нейтрофилы в первые дни после инфицирования экспериментальных животных. Кроме того, нам было интересно проверить, будет ли одинаковым эффект удаления нейтрофилов в генетически разных по чувствительности линиях мышей. Для этого мышей чувствительной и устойчивой к ТБ линий I/St и B6, соответственно, заражали аэрозольно вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в низкой дозе (100 КОЕ/мышь). Через 2 и 6 дней после инфицирования животным вводили высокоаффинные и специфичные крысиные мАТ против нейтрофилов (anti-Ly6G, клон 1A8), внутрибрюшинно по 150 мкг/мышь. Затем мы оценили основные параметры тяжести течения ТБ – бактериальную нагрузку в легких и селезенке, потерю веса и

продолжительность жизни зараженных животных. Кроме того, мы оценили общую патологию и уровень инфильтрации легких нейтрофилами.

Введение мАТ привело к эффективной элиминации нейтрофилов на 94% и 96% в периферической крови через 10 дней после заражения у чувствительных и устойчивых мышей, соответственно. Приблизительно половинное восстановление популяции нейтрофилов наблюдалось только через 21 день после заражения.

Как показано на Рисунке 1, удаление нейтрофилов приводит к снижению бактериальной нагрузки в легких и селезенке, увеличению продолжительности жизни и отсрочке в потере веса зараженных мышей чувствительной линии I/St (Рисунок 1А, В, Д), но не устойчивой линии В6 (Рисунок 1Б, Г). Эти данные свидетельствуют о патогенетической роли нейтрофилов именно у животных, склонных к массивной нейтрофилии и образованию некротических поражений. Действительно, и патология легких, во многом обусловленная массивным притоком нейтрофилов, сильно уменьшилась у животных, которым ввели АТ против нейтрофилов (Рисунок 2).



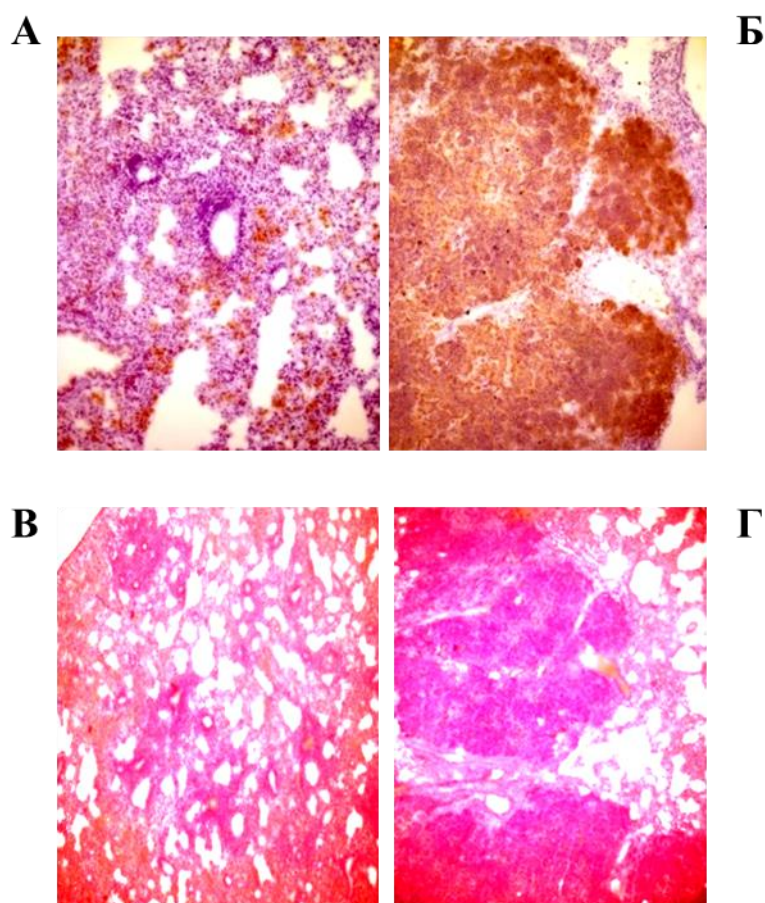


Рисунок 2. Введение элиминирующих нейтрофилы антител предотвращает образование массивных нейтрофильных скоплений в лёгких и способствует уменьшению общего воспаления. Иммуногистохимическая окраска мАТ анти-Ly6G (верхние панели, коричневый) и общая патология (окраска гематоксилин-эозином, нижние панели) криопрепаратов легкого через 5 недель после заражения мышей I/St с введенными АТ 1А8 (А, В) или изотипического контроля (Б, Г).

4.1.2 Истощение нейтрофилов способствует увеличению продукции IFN- γ

Ранее было показано, что IFN- γ , продуцируемый Т-лимфоцитами CD4⁺, способствует снижению притока нейтрофилов и опосредованной ими патологии [Nandi B., Behar S.M., 2011]. В связи с этим мы предположили, что удаление нейтрофилов на начальной фазе формирования Т-клеточного ответа может иметь зеркальный эффект и способствовать увеличению продукции IFN- γ в лимфоидных органах. Для проверки этой гипотезы мы оценили количество IFN- γ -

продуцирующих клеток в селезенке мышей с удаленными нейтрофилами по сравнению с контрольными животными через 4 недели после заражения.

Оказалось, что количество IFN- γ -продуцирующих клеток в 5 раз выше в селезенке у мышей с элиминированными нейтрофилами по сравнению с контрольными животными (Рисунок 3). Эти данные свидетельствуют об антагонистском действии нейтрофилов и иммунных Т-лимфоцитов в ходе развития туберкулезной инфекции.

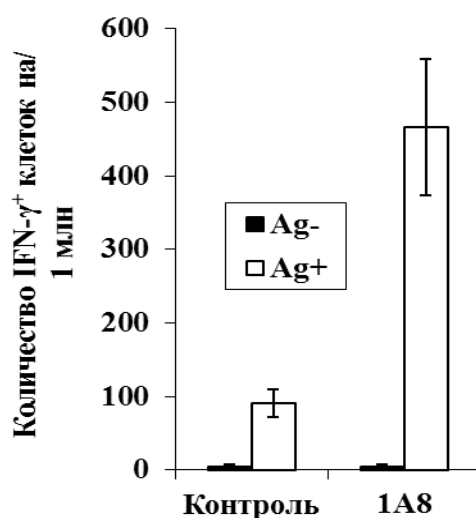


Рисунок 3. Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами значительно выше ($P < 0,01$) у мышей I/St с удаленными нейтрофилами, чем у контрольных животных. Спленоциты, выделенные от мышей I/St через 4 недели после заражения, культивировали в течение 48 часов без (Ag-) или с добавлением смеси микобактериальных антигенов (Ag+, 10 мкг/мл). Данные получены методом ELISPOT. Представлены данные одного из двух экспериментов, среднее \pm SD, 4-5 мышей в группе.

4.1.3 Нейтрофилы подавляют включение радиоактивного тимидина

Как описано выше, при ТБ удаление нейтрофилов способствует повышению продукции IFN- γ Т-лимфоцитами, что может свидетельствовать об ингибирующей роли нейтрофилов. Кроме того, в работе D'Avila с соавторами [2008] было показано, что после поглощения бактерий BCG нейтрофилами, и, в свою очередь,

инфицированных нейтрофилов макрофагами, последние выделяют простагландин E2 (PGE2) и TGF- β – ингибиторы активации T-лимфоцитов. Параллельно, в одном из наших исследований мы обнаружили, что специфические T-лимфоциты, пролиферирующие в ответ на презентацию микобактериальных АГ макрофагами, не включают радиоактивный тимидин, а значит, возможно, не пролиферируют, если в культуре присутствуют нейтрофилы, выделенные из перитонеальной полости мышей. В связи с этим мы стали изучать природу ингибирующего действия нейтрофилов более подробно.

В первой серии экспериментов мы проверили, необходим ли для подавления контакт T-лимфоцитов и/или макрофагов с нейтрофилами, или в качестве ингибитора выступает некий растворимый фактор. Для проверки этой гипотезы мы получили супернатанты 48-часовых культур нейтрофилов (сНф). Затем мы провели серию экспериментов с добавлением полученного сНф в совместную культуру макрофагов и T-лимфоцитов. Мы показали, что добавление сНф в совместную культуру макрофагов и T-лимфоцитов достоверно снижает включение радиоактивного тимидина в пролиферирующие T-лимфоциты, и этот эффект зависит от дозы сНф (Рисунок 4 А).

Поскольку нейтрофилы – короткоживущие клетки, срок жизни которых составляет *in vitro* 24-48 ч, мы проверили, выделяют ли они изучаемый фактор активно, или он высвобождается и накапливается в среде вследствие гибели нейтрофилов. Оказалось, что уже через 6 ч культивирования, когда не наблюдалось никакой гибели клеток, нейтрофилы выделяют в среду количество фактора, достаточное для достоверного подавления включения метки в пролиферирующие T-лимфоциты (Рисунок 4 Б). Вместе с тем снижение пролиферативной активности может быть следствием истощения среды, в которой культивировались нейтрофилы. Чтобы исключить этот эффект, мы провели серию экспериментов в системе Transwell, в которой отвечающие на антиген клетки располагаются в нижней камере, отделенной непроницаемой для клеток мембраной от верхней

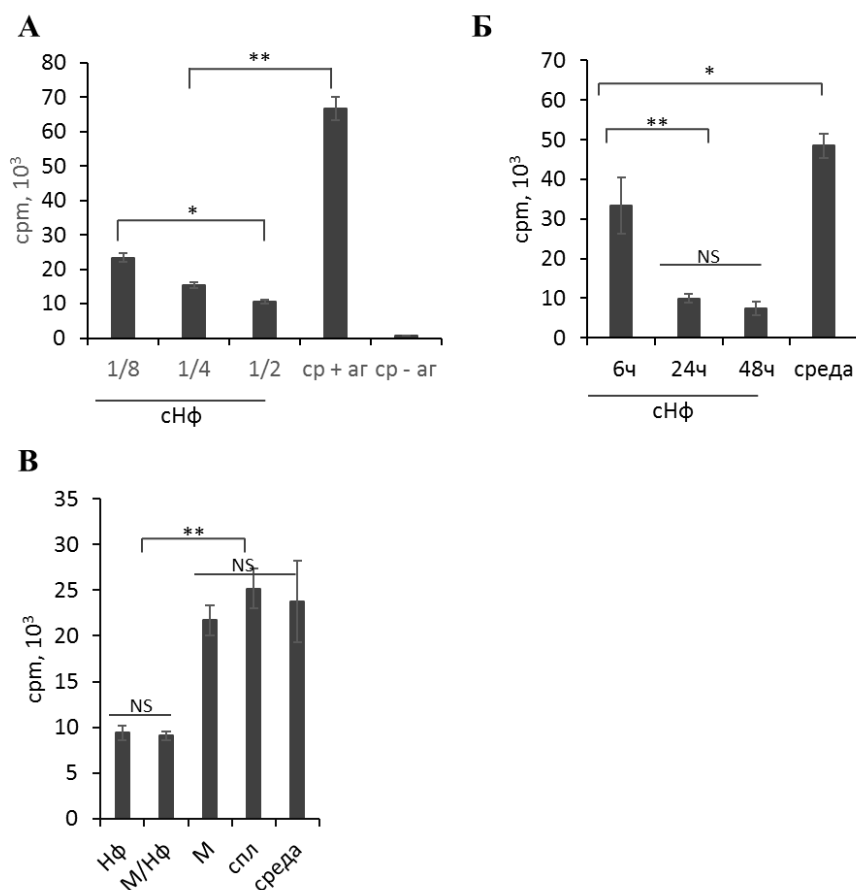


Рисунок 4. Выделяемый нейтрофилами фактор блокирует включение метки Т-лимфоцитами. **А** – Оценка включения [³H]-тимидина в пролиферирующие в присутствии АПК и антигена (ср+аг) Т-лимфоциты, «ср-аг» - контроль без добавления антигена. Добавление культуральной среды нейтрофилов (сНф) снижает включение метки, и этот эффект зависит от дозы («1/2, 1/4, 1/8» – разведение сНф в 2, 4 и 8 раз, соответственно). **Б** – Оценка включения [³H]-тимидина в пролиферирующие Т-клетки в присутствии сНф, собранного через 6, 24 и 48 ч культивирования нейтрофилов. **В** – Подавление включения метки наблюдается после прохождения «фактора нейтрофилов» через мембрану в системе Transwell, а не за счет истощения среды. Приведены выбранные данные из 2-6 независимых экспериментов каждого типа. Результаты представлены в виде средних CPM ± SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

камеры, куда помещаются клетки, производящие изучаемый фактор. В качестве контроля истощения среды были взяты спленоциты, макрофаги или чистая среда. Как показано на Рисунке 4В, именно помещенные в верхнюю камеру нейтрофилы, в отличие от макрофагов или клеток селезенки, продуцируют ингибирующий фактор.

4.1.4 Подавляющий включение метки фактор – низкомолекулярное устойчивое вещество

По имеющимся в литературе данным, наиболее известными ингибиторами Т-клеточной активности являются IL-10, TGF- β , PGE2 и аргиназа [Muller I., et al., 2009; Nagarai S., et al., 2013]. Методом ELISA мы обнаружили достаточные количества этих факторов в сНф. В связи с этим мы решили проверить, участвуют ли они в подавлении ответа Т-лимфоцитов. Для этого мы провели серию экспериментов, в которых в совместную культуру Т-лимфоцитов, макрофагов и сНф добавляли специфические блокаторы перечисленных факторов, а именно блокирующие АТ к IL-10, к TGF- β , индометацин и *no*NOHA. Как показано на Рисунке 5А, ни один из исследуемых ингибирующих факторов не отменял в достаточной степени наблюдаемого нами подавления включения метки.

Кроме того, мы показали, что исследуемый фактор устойчив к кипячению и неоднократному замораживанию/оттаиванию (Рисунок 5Б). Последующий диализ исследуемого сНф позволил определить, что размер исследуемого компонента меньше 10кДа (Рисунок 5В).

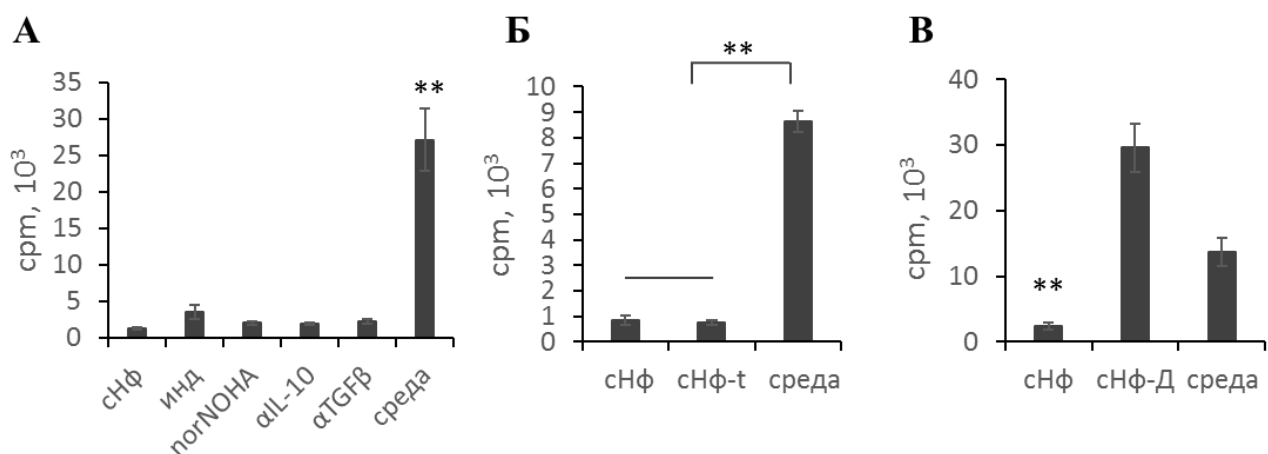


Рисунок 5. Фактор, подавляющий включение метки – это низкомолекулярный продукт, устойчивый к нагреванию. **А** – действие «фактора нейтрофилов» не отменяется блокированием основных ингибиторов пролиферации Т-клеток: простагландина E2 (индометацин), аргиназы (norNOHA), IL-10 (блокирующие антитела) и TGF-β (блокирующие антитела). **Б** – фактор не теряет активности после кипячения, сНФ-t – сНФ после кипячения. **В** – По результатам диализа м. м. фактора не превышает 10 кДа. Приведены выбранные данные из 2-3 независимых экспериментов каждого типа. Результаты представлены в виде средних CPM ± SD. ** P < 0,01.

4.1.5. Фактор сНФ подавляет включение радиоактивной метки, но не пролиферацию клеток

Далее мы проверили, действует ли исследуемый фактор только на включение метки в пролиферирующие Т-лимфоциты в ответ на специфические антигены, или это явление носит более общий характер. Мы показали, что выделяемый нейтрофилами низкомолекулярный компонент подавляет включение метки в пролиферирующие Т-лимфоциты в ответ на стимуляцию антителами к CD3, конканавалином А, а также в спонтанно пролиферирующие опухолевые клетки миеломы (Рисунок 6А). Стоит отметить, что анализ включения [³H]-тимидина – это стандартный способ оценки степени пролиферации клеток. В наших экспериментах, при оценке состояния клеток в микроскопе во всех случаях было

явственно видно, что клетки пролиферировали (образовывали бласты), несмотря на отсутствие включения радиоактивного [³H]-тимидина. Этот факт был подтвержден дополнительным анализом пролиферации клеток с помощью CFSE. В присутствии сНф клетки миеломы пролиферируют (Рисунок 6Б), но не включают [³H]-тимидин. Таким образом, исследуемый нами ингибитор влиял не на пролиферацию клеток, а подавлял только включение радиоактивной метки.

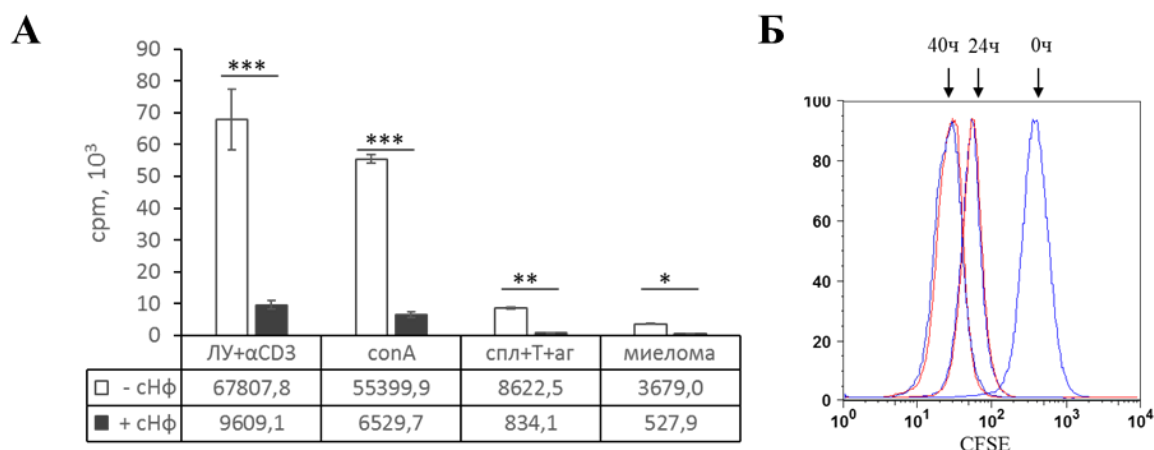


Рисунок 6. А – Оценка включения [³H]-тимидина в пролиферирующие клетки в присутствии сНф (+сНф) или без него (-сНф). **Б** – Оценка пролиферации клеток миеломы через 24 и 40 ч культивации в присутствии (красная линия) или без добавления сНф (синяя линия). Оценка с помощью проточной цитометрии по разбавлению метки CFSE. Приведены выбранные данные 2-3 независимых экспериментов каждого типа. Результаты представлены в виде средних CPM ± SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,005$.

4.1.6 Фактор, подавляющий включение [³H]-тимидина – это тимидин

Для идентификации искомого компонента на следующем этапе наших исследований мы фракционировали сНф с помощью ВЭЖХ. Ступенчатое последовательное разделение получаемых образцов (Рисунок 7, левая часть) с параллельным исследованием активности включения [³H]-тимидина стимулированными Т-лимфоцитами (Рисунок 7, правая часть) позволило выделить фракцию, содержащую компонент, ингибирующий подавление включения метки.

По анализу методом масс-спектрометрии единственный пик фракции 3.1.1 соответствовал массе 242 Да. Последующий анализ фракции 3.1.1 методом ЯМР позволил установить строение исследуемого фактора. Спектр протонного резонанса (Рисунок 8А), а также двумерные спектры DQF COSY (Рисунок 8Б) и ^{13}C - ^1H HSQC (Рисунок 8В) однозначно свидетельствуют о том, что исследуемый фактор – это тимидин. Его молекулярная масса и спектральные параметры полностью соответствуют описанным в литературе (http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?molName=thymidine&id=bmse000244). Кроме того, добавление «фактора нейтрофилов» в культуру клеток мышины тимомы EL4, для которой тимидин высоко токсичен [Stadecker M. J., et al., 1977], действительно приводил к быстрой гибели клеток. Таким образом, фактор, подавляющий включение меченного [^3H]-тимидина в пролиферирующие клетки, – это спонтанно секретлируемый нейтрофилами тимидин. Мы также показали, что подобным свойством обладают и нейтрофилы, выделенные из легких инфицированных ТБ мышей (рис. 9).

Ранее было показано, что макрофаги [Opitz H. G., et al., 1975, Stadecker M. J., et al., 1977] и некоторые виды опухолей также могут высвобождать свободный тимидин [Spilsberg B., et al., 2006]. Физиологическая роль этого явления до конца не ясна. Возможно, что обнаруженный нами тимидин, один из четырех нуклеозидов входящих в состав ДНК, является частью выбрасываемых нейтрофилами ловушек NETs [Vorobjeva N.V., Pinegin B.V., 2014], в состав которых входят нити ДНК. Неизвестно, секретлируют ли нейтрофилы 3 другие нуклеозида, входящих в состав ДНК, но выброс из клетки хотя бы одного из четырех заставляет задуматься о возможной связи этого процесса с образованием и(или) деградацией ДНК-ловушек.

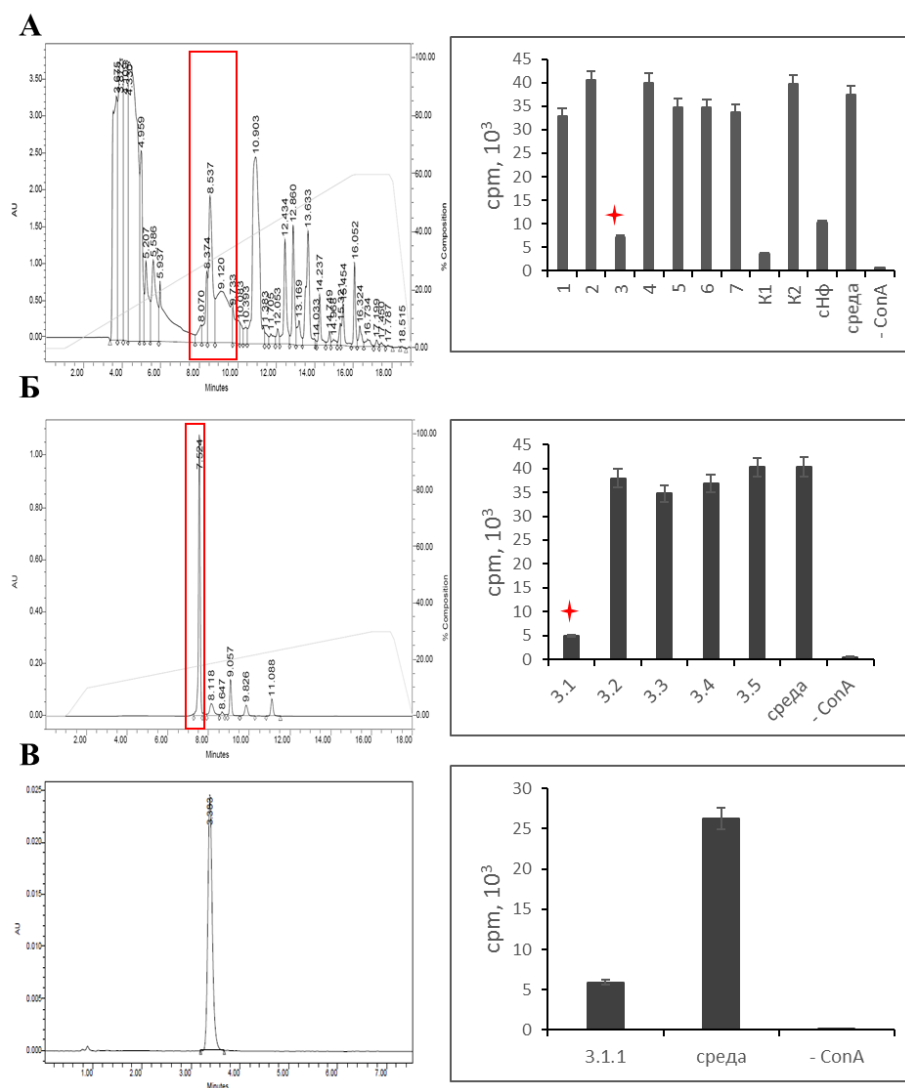


Рисунок 7. Последовательная очистка «фактора нейтрофилов» методом HPLC (слева) с проверкой биологической активности фракций (справа). **А** – сНф после ультрафильтрации (мембрана 10 кДа) разделен на хроматографической колонке на 7 фракций (слева). Полученные фракции были проверены на способность подавлять включение [³H]-тимидина в пролиферирующие Т-клетки, стимулированные соnA (справа). Фракцию 3, обладающую ингибирующей активностью (помечена звездочкой справа, и выделено в рамке на спектре HPLC слева), подвергли дальнейшему разделению на колонках. **Б** – последующее разделение, аналогично пункту «А». **В** – Анализ монофракции 3.1.1, обладающей ингибирующей активностью. K1 – фильтрат до разделения на колонке (компоненты <10кДа), K2 – концентрат (компоненты >10кДа), сНф – супернатант нейтрофилов до разделения.

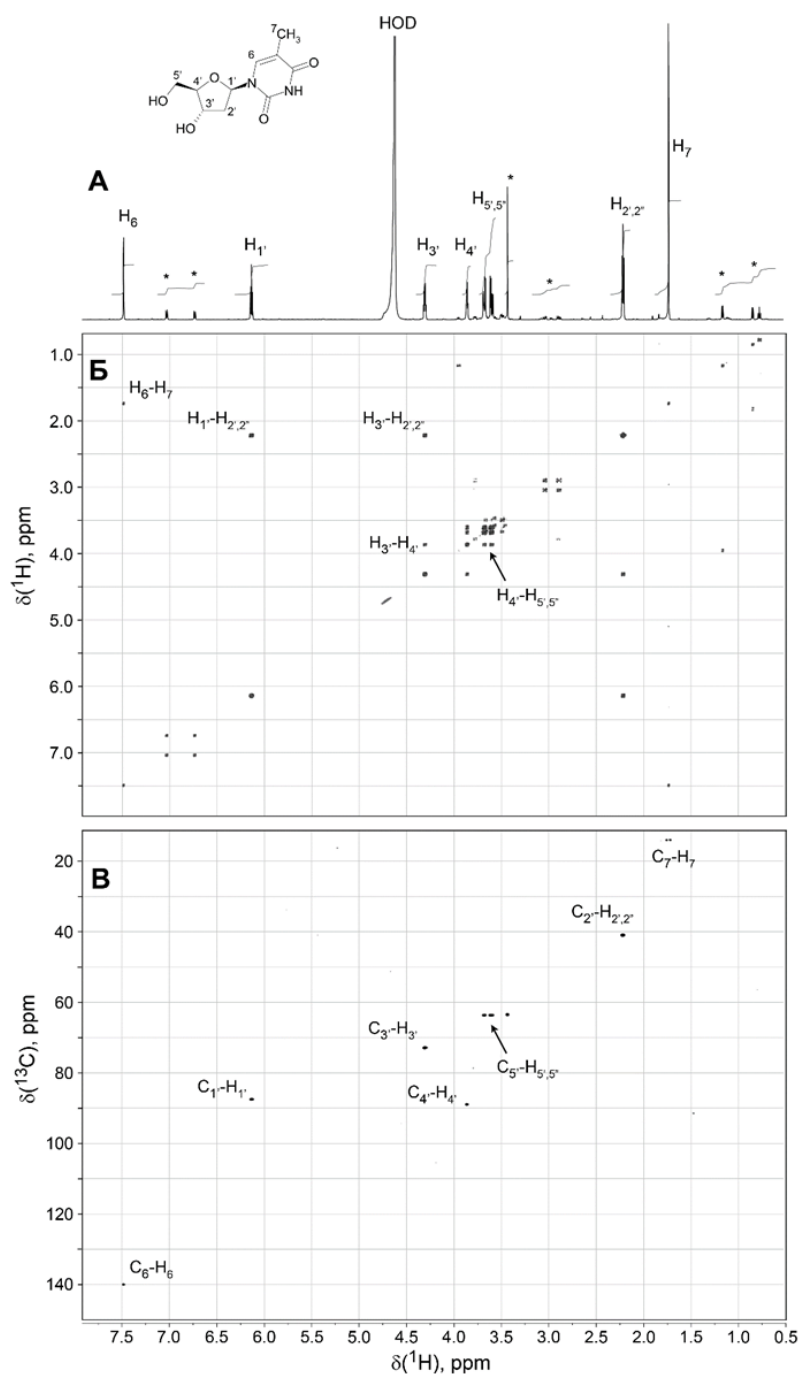


Рисунок 8. «Фактор нейтрофилов», подавляющий включение [³H]-тимидина – это тимидин. Спектры ЯМР «фактора нейтрофилов», использованные для установления его строения: 1D спектр протонного резонанса (А), 2D спектр DQF COSY (Б) и 2D спектр гетероядерной корреляции ¹³С-¹Н HSQC (В). Вверху приведена структурная формула тимидина. На спектрах показано отнесение сигналов ¹Н и ¹³С тимидина. Звездочкой на одномерном спектре отмечены сигналы минорной не идентифицированной примеси.

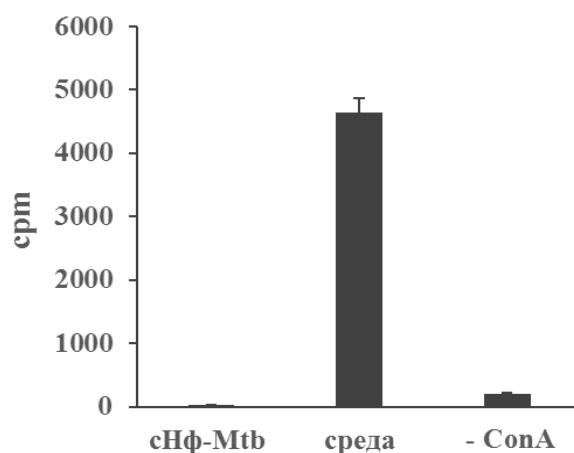


Рисунок 9. Легочные нейтрофилы при ТБ также продуцируют большие количества «фактора нейтрофилов». Оценка включения [^3H]-тимидина в пролиферирующие Т-лимфоциты в присутствии супернатанта нейтрофилов, выделенных из легких мышей ($n=4$), зараженных ТБ (сНф-Mtb). В качестве контроля клетки культивировались в среде без добавления сНф (среда) или без стимулятора пролиферации (-ConA). Результаты представлены в виде средних CPM \pm SD.

4.1.7 Нейтрофилы при воспалении, вызванном микобактериями *M. avium*

Роль нейтрофилов при инфекции, вызванной *M. avium*, не ясна. Ранее в нашей лаборатории было показано, что при заражении бактериями *M. avium* мышей линий I/St и В6, они проявляют зеркальный по чувствительности фенотип по сравнению с заражением ТБ: мыши линии I/St устойчивы, а В6 – чувствительны к этой инфекции [Kondratieva E., et al., 2007]. Это связано с экспрессией устойчивого аллеля r и чувствительного аллеля s гена *slc11a1* (прежнее название *Nramp1*), кодирующего протонную помпу мембраны фагосомы для двухвалентных катионов [Canonne-Hergaux F., et al., 1999], в том числе железа, необходимого для питания микобактерий [De Voss J.J., et al., 1999]. В связи с тем, что бактерии *M. avium*, в отличие от *M. tuberculosis*, не могут выходить из фагосом в цитозоль, отсутствие доступа к железу является критическим для их выживания, что, скорее всего и объясняет различия в генетическом контроле двух инфекций.

Кроме того, недавно в нашей лаборатории были проведены эксперименты по переносу чувствительного к ТБ H2-зависимого генотипа мышей I/St на устойчивую

генетическую основу мышей В6. В результате были получены новые линии В6.І-100 (В100) и В6.І-139 (В139), отличающиеся лишь β -цепью молекулы класса II *H2-A* [Logunova N., et al., 2015]. В100 – имеет чувствительный к *M. tuberculosis* аллель *H2-A^j* от родительской линии I/St, а В139 – устойчивый аллель *H2-A^b* от родительской линии В6. Генетическая основа у этих линий одинакова, включая аллель *s* гена *slc11a*, расположенного на хромосоме 1. В отличие от *M. tuberculosis*, о влиянии на инфекцию, вызванную *M. avium*, аллелей (гаплотипов) *MHC* ничего не известно. Имея такой инструмент, мы решили проверить, во-первых, будет ли влиять различие только по продукту *MHC* класса II дополнительно на чувствительность к *M. avium*, на фоне общей чувствительности, обусловленной *s* аллелем гена *slc11a1*, и, во-вторых, определить, играют ли в этом какую-то роль нейтрофилы.

Мы показали, что мыши В100 и В139 также, как и родительские линии, проявляют зеркальный фенотип по чувствительности к *M. avium*, по сравнению с заражением *M. tuberculosis*, хотя и в более слабой форме. Это выражается в более быстрой потере веса и более ранней гибели животных В139 после инфицирования (Рисунок 10 А, Б). Примечательно, что в отличие от туберкулезной инфекции, более сильный приток нейтрофилов в легкие наблюдался у мышей более устойчивой линии В100. Это видно по оценке при анализе с помощью проточной

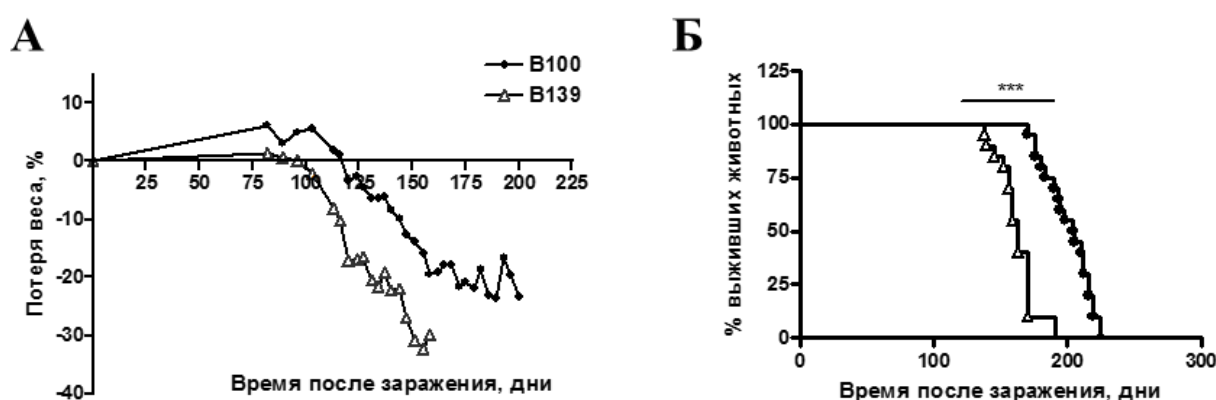


Рисунок 10. Потеря веса (А) и продолжительность жизни (Б) мышей В100 и В139 при аэрозольном инфицировании *M. avium*. Приведены результаты одного из двух экспериментов, n=10-17. Выживание, log-rank test, *** $P < 0,001$.

цитофлуориметрии, а также при исследовании окрашенных специфическими антителами криопрепаратов легких (Рисунок 11 А, Б). Большой приток нейтрофилов был ассоциирован с повышенной экспрессией генов хемокинов CXCL1 и CXCL2, а также цитокина IL-17 – хемоаттрактантов нейтрофилов (Рисунок 11В). Вместе с тем, на поздних стадиях инфекционного процесса количество нейтрофилов в легких значительно возросло и было одинаковым у

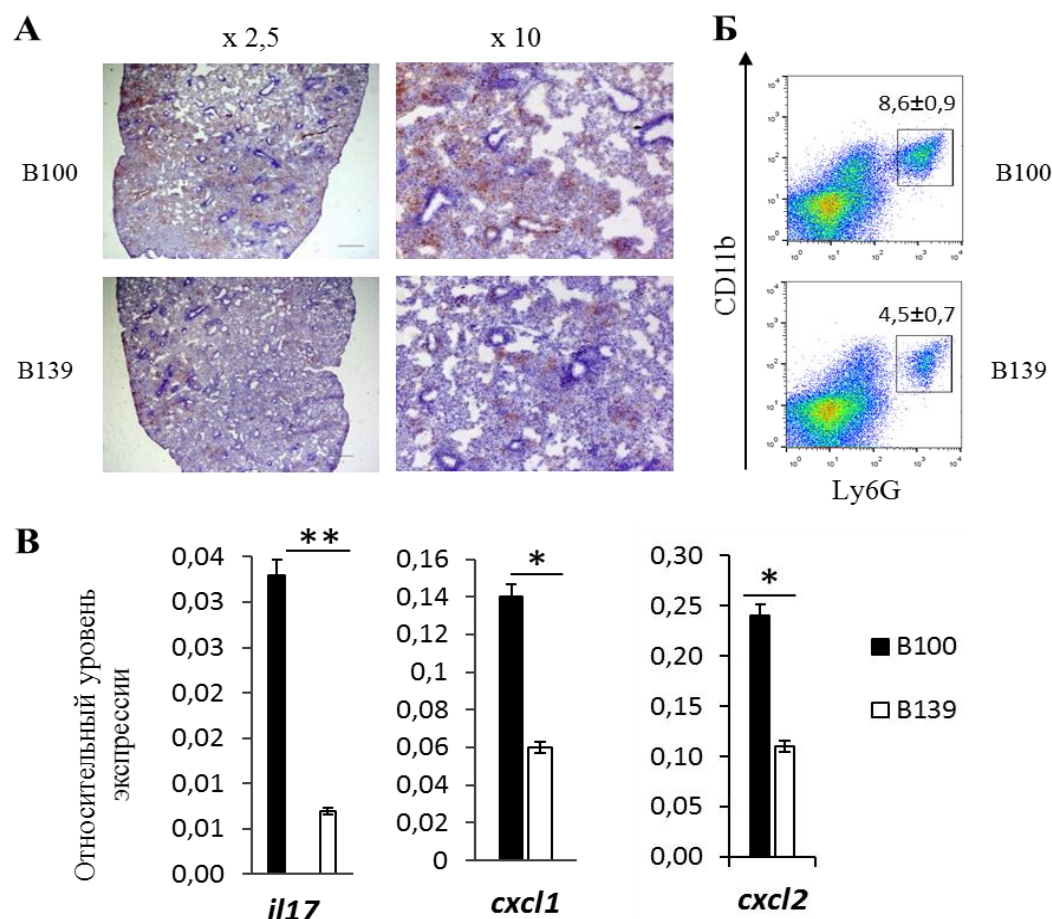


Рисунок 11. А – Иммуногистохимическое окрашивание криопрепаратов легкого мАТ анти-Ly6G, с докрасиванием гематоксилином через 8 недель после заражения мышей В100 и В139. Б – Анализ количества нейтрофилов в легком с помощью проточной цитофлуориметрии специфическими мАТ анти-Ly6G и анти-CD11b. В – Оценка экспрессии генов хемоаттрактантов нейтрофилов методом ПЦР в реальном времени относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. Представлены данные одного из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе. Результаты представлены в виде средних ± SD (В).

животных двух линий (данные не приведены). Возможное объяснение столь разного влияния нейтрофилов на течение двух инфекций может лежать в области различий во внутриклеточной жизни двух возбудителей (см. выше) и явно выраженной низкой вирулентностью *M. avium*.

4.1.8 Уровень апоптоза и бактерицидные свойства нейтрофилов

Показано, что при заражении *M. tuberculosis* нейтрофилы, поглощающие бактерии, могут погибать путем апоптоза или некроза [Aleman M., et al., 2002, Aleman M., et al., 2004, Berry M., et al., 2010, Dallenga T., et al., 2018]. Если нейтрофилы погибают путем апоптоза, последующий фагоцитоз таких нейтрофилов макрофагами приводит к эффективному уничтожению поглощенных микобактерий. В связи с этим мы решили оценить, как способность нейтрофилов убивать *M. avium in vitro*, так и уровень апоптоза нейтрофилов в легких мышей В100 и В139 после аэрозольного заражения *M. avium* в тот момент, когда количество нейтрофилов отличается, поскольку это могло влиять на активацию макрофагов и, как следствие, Т-лимфоцитов и общий исход заболевания.

Мы показали, что уровень апоптоза не различался в легочных нейтрофилах мышей обеих линий через 8 недель после заражения (Рисунок 12А). Кроме того, нейтрофилы этих мышей были не способны убивать микобактерии *M. avium in vitro* (Рисунок 12Б, В). Вместе с тем уровень апоптоза легочных макрофагов был выше у мышей более устойчивой линии В100. Таким образом, в рассматриваемой модели нейтрофилы, сами по себе, скорее всего не отличаются по способности элиминировать микобактерии. Логично предположить, что разница в притоке нейтрофилов связана с общим легочным воспалением, но не со специфическими свойствами нейтрофилов. Это соотносится с ранее опубликованными данными, что удаление нейтрофилов в момент формирования адаптивного иммунного ответа у чувствительных к микобактериям *M. avium* мышей В6 не влияет на продолжительность их жизни и не приводит к изменению бактериальной нагрузки в селезенке и печени [Petrofsky M., Bermudez L.E., 1999].

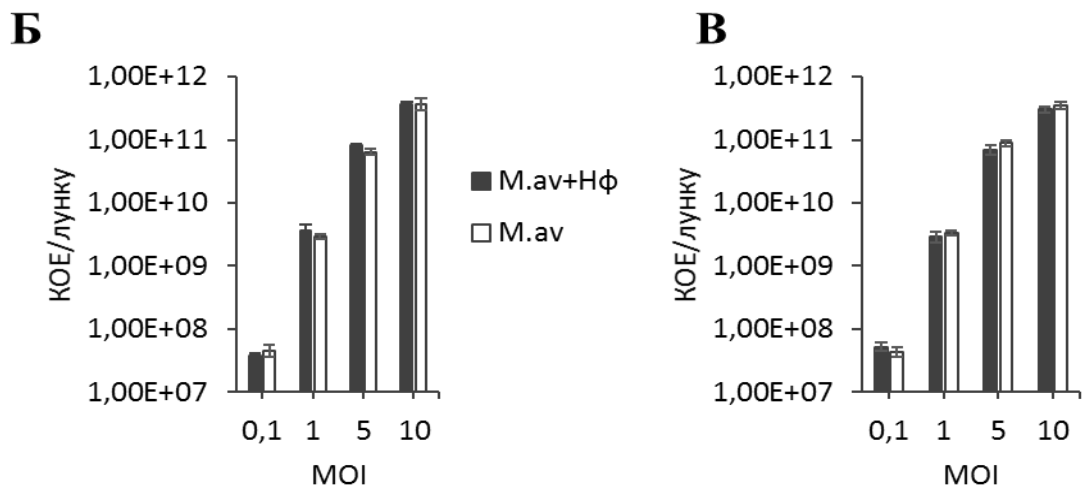
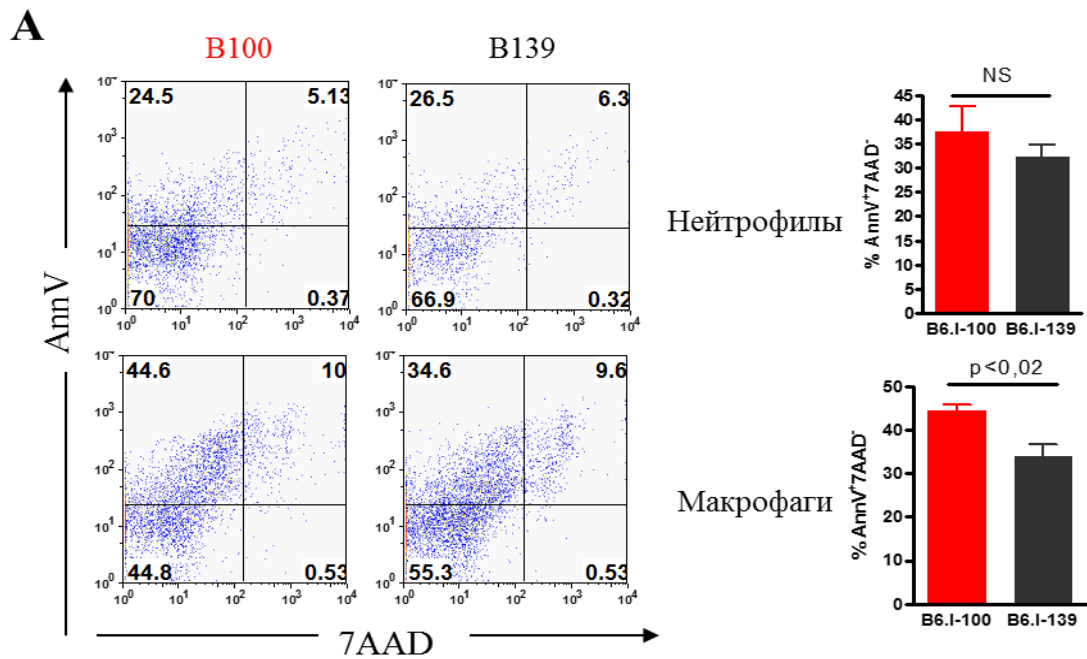


Рисунок 12. Нейтрофилы мышей В100 и В139 не отличаются по уровню апоптоза и не способны убивать микобактерии *M. avium in vitro*. **А** – Анализ раннего апоптоза (AnnV⁺7AAD⁻) легочных нейтрофилов Ly6G⁺ (верхние панели) и макрофагов F4/80⁺ (нижние панели) мышей В100 и В139 через 8 недель после заражения *M. avium*, методом проточной цитофлуориметрии. 5 мышей в группе. **Б**, **В** – Оценка способности нейтрофилов убивать микобактерии *M. avium* через 3 (**Б**) и 14 (**В**) часов совместной инкубации *in vitro*. Нейтрофилы вносили в количестве 50x10³/лунку. Микобактерии вносили в лунки в соотношении MOI= 0,1; 1; 5 и 10. Количество микобактерий оценивали после высева соответствующих лунок (триплеты) на чашки Петри с агаром Дюбо, результаты представлены в виде средних ± SD. Приведены данные одного из двух экспериментов.

4.2. В-лимфоциты при микобактериальных инфекциях

Роль В-лимфоцитов при туберкулезной инфекции остается довольно загадочной. Как подробно описано в литературном обзоре, В-клетки мигрируют в легкое и формируют там фолликулы, напоминающие В-фолликулы вторичных лимфоидных органов. Эти структуры обнаруживаются у больных ТБ [Ulrichs T., et al., 2005, Ulrichs T., et al., 2004], а также в экспериментальных моделях у макаков [Phuah J.Y., et al., 2012] и мышей, инфицированных *M. tuberculosis* [Gonzalez-juarrero M., et al., 2001, Kondratieva E., et al., 2010, Slight S.R., et al., 2013, Linge I., et al., 2016] и *M. avium* [Kondratieva E., et al., 2007]. Несмотря на обилие данных, физиологическая роль легочных В-фолликулов при туберкулезе исследована мало, а при инфекции, вызванной *M. avium*, не исследована вообще.

4.2.1. Динамика накопления В-лимфоцитов и формирования В-фолликулов у мышей с разной генетической чувствительностью к *M. tuberculosis*

Для более глубокого понимания роли В-лимфоцитов и легочных фолликулов в патологии микобактериальных инфекций для начала мы оценили динамику накопления В-клеток в легких мышей чувствительной и устойчивой к *M. tuberculosis* линий В6 и I/St, соответственно. На Рисунке 13 показано, что В-клетки постепенно накапливаются в легких, достигая своего максимума через 8-10 недель, после чего их количество снижается. Суммарное количество В-фолликулов и площадь легкого, занимаемая ими, совпадает с общей динамикой накопления В-клеток. Однако, если у чувствительных мышей I/St, относительное содержание В-клеток в легких снижается до 3-5 %, а В-фолликулы расформируются, то содержание В-лимфоцитов у мышей В6 сохраняется на уровне 15-25% на протяжении длительного времени в хронической стадии развития инфекции (Рисунок 13 А, В). Через 16 недель после заражения в легких мышей В6 наблюдаются крупные скопления В-лимфоцитов вблизи бронхов, а также в ткани вблизи скопления макрофагов (Рисунок 13 В, Г). На поздних сроках развития инфекции у устойчивых мышей В6 В-клетки обнаруживаются не только в

сформированных В-фолликулах (Рисунок 14, верхние панели), но и рассеяны по всей ткани легкого наравне с Т-лимфоцитами CD4⁺ (Рисунок 14, нижние панели).

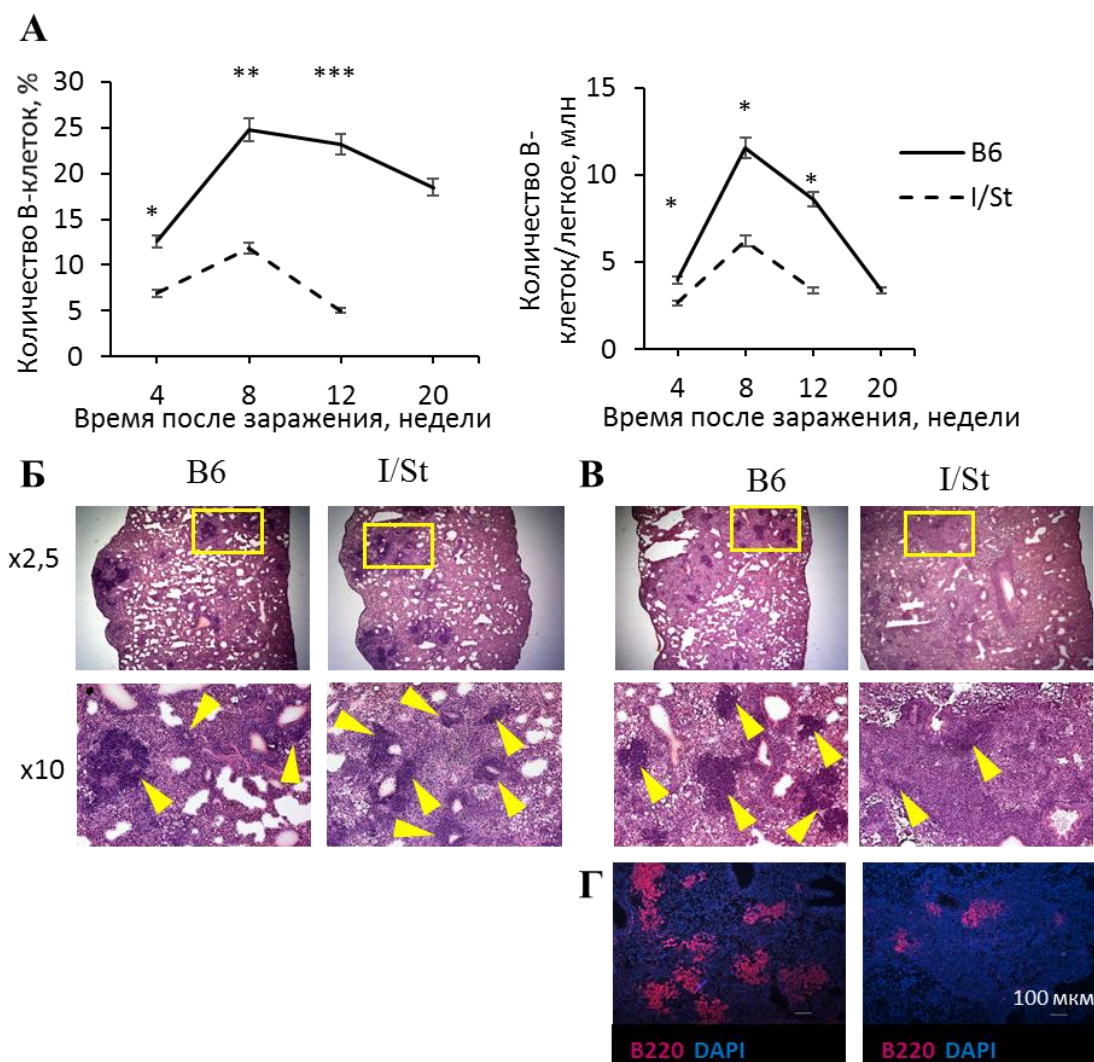


Рисунок 13. А – Динамика миграции В-лимфоцитов (B220⁺CD19⁺) в легкие мышей устойчивой и чувствительной линий В6 и I/St, соответственно, после заражения вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. 4-5 мышей в группе в каждой точке измерений. Результаты представлены в виде средних \pm SD. Б, В – Оценка патологии легких и локализации В-фолликулов (указаны желтыми стрелками) через 8 (Б) и 16 (В) недель после заражения. Выделенные желтым прямоугольником фрагменты на верхних панелях (увеличение x2,5) представлены в большем увеличении (x10) на нижних панелях. Г – Иммуногистохимическое окрашивание криопрепаратов легкого специфическими флуоресцентно-меченными мАТ анти-B220-Cy3 (розовый) через 16 недель после заражения. DAPI (синий) – окраска ядер клеток. Данные одного из трех независимых экспериментов.

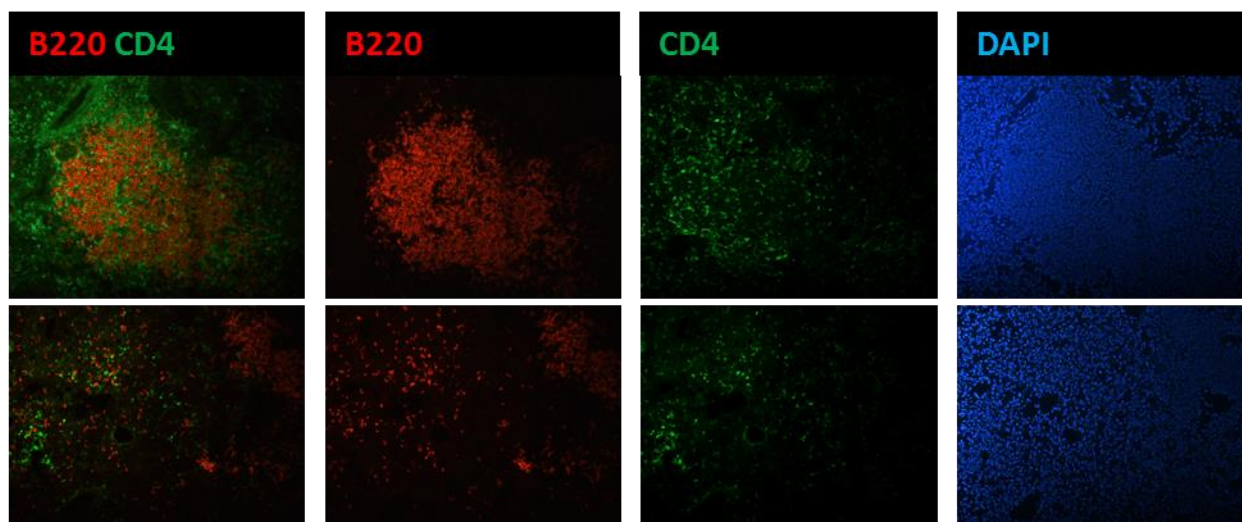


Рисунок 14. Иммуногистохимическое окрашивание криопрепаратов легкого мышей устойчивой линии В6 через 25 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. B220 (красный) – В-лимфоциты, CD4 (зеленый) – Т-лимфоциты CD4⁺, DAPI (синий) – окраска ядер. Увеличение, x20.

4.2.2. В-лимфоциты мигрируют в легкое и размножаются in situ

Для того, чтобы оценить происхождение накапливающейся в легком популяции В-клеток, мы проверили, мигрируют ли В-клетки из крови и/или размножаются непосредственно в легком. Для этого через 3 недели после заражения мы выделили клетки селезенки мышей В6.GFP, у которых ген зеленого флуоресцентного белка GFP (Green fluorescent protein) стоит под промотором гена *act* (актина), благодаря чему все клетки этих животных флуоресцируют. Затем В-лимфоциты мышей В6.GFP были введены внутривенно мышам дикого типа В6 также через 3 недели после заражения ТБ, т. е. в момент, когда В-клетки начинают формировать фолликулы в легком. Мы оценили количество В-лимфоцитов GFP⁺ в легком, плевральной полости и селезенке реципиентов через 2, 7, 14, 21 и 28 дней после введения клеток (Рисунок 15 А) и показали, что В-лимфоциты GFP⁺ мигрируют в легкие, плевральную полость и селезенку, обнаруживаются там в течение 4 недель после введения, после чего их количество снижается.

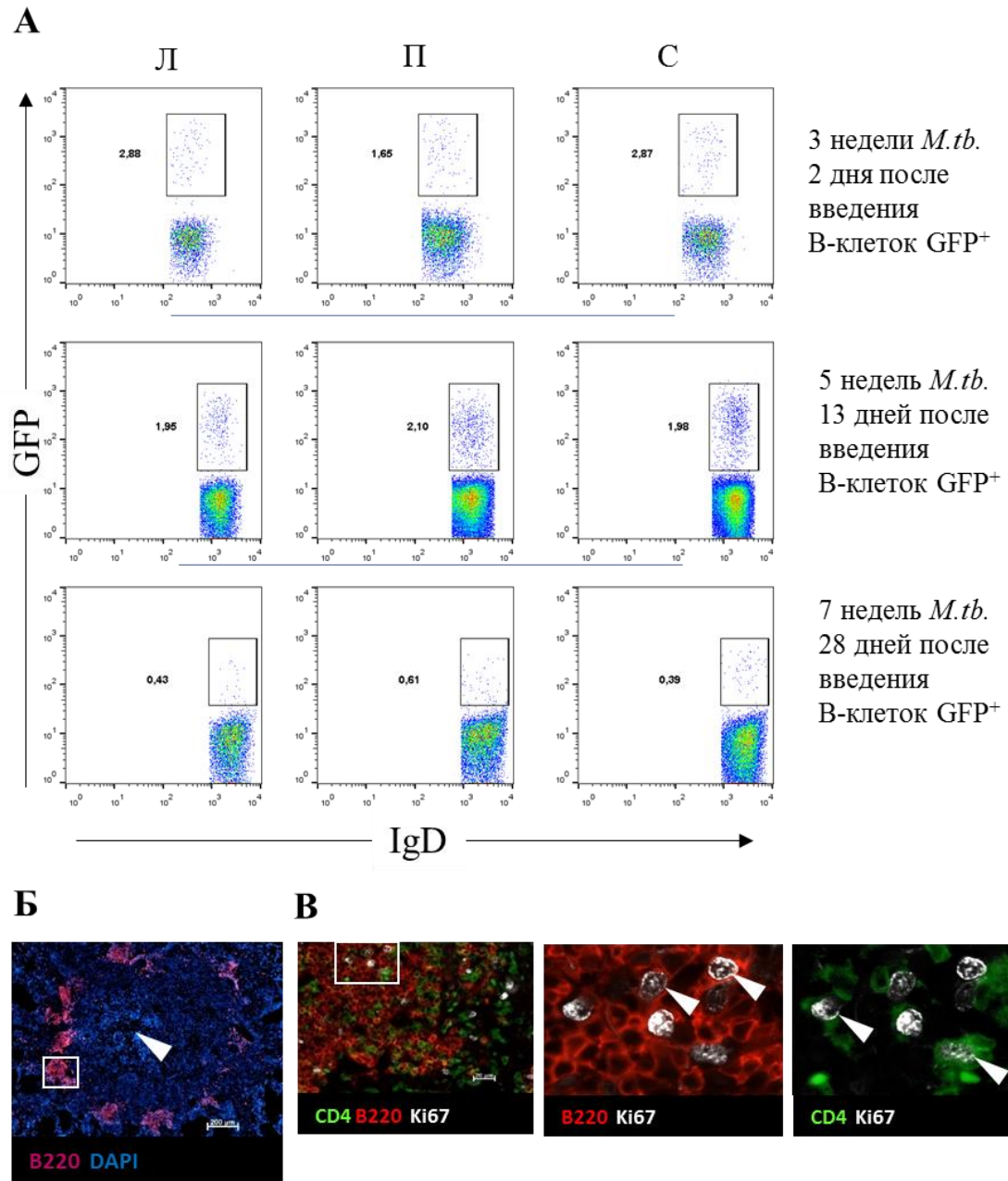


Рисунок 15. А – Оценка миграции в легкое (Л), плевральную полость (П) и селезенку (С) В-лимфоцитов GFP⁺, введенных внутривенно через 3 недели после заражения *M. tuberculosis* мышей В6 (FACS-анализ клеток легкого по маркеру В-лимфоцитов IgD совместно с флюоресценцией GFP). Б – Анализ формирования В-фолликулов в ткани легкого чувствительных к ТБ мышей I/St через 7 недель после заражения (ИГХ окрашивание криопрепаратов легкого мАТ против B220 (красный)). В – *In situ* пролиферация В- и Т-лимфоцитов CD4⁺, маркер пролиферации Ki67 (белый).

Кроме того, мы решили проверить, меняется ли число В-лимфоцитов только благодаря миграции в легкое, или В-клетки могут размножаться *in situ*. Для ответа на этот вопрос мы произвели иммуногистохимическое окрашивание криопрепаратов легкого специфическими мАТ к маркеру пролиферации Ki67. Мы показали, что формирование В-фолликулов сопровождается локальной пролиферацией тесно контактирующих В- и Т-лимфоцитов CD4⁺ (Рисунок 15 Б, В), что свидетельствует о формировании зародышевых центров.

4.2.3. Фенотип В-лимфоцитов легких при ТБ

Популяция В-лимфоцитов состоит из разных типов клеток, отличающихся по своим функциям и внешним маркерам. Мы провели детальную характеристику поверхностного фенотипа В-лимфоцитов в формирующихся В-фолликулах легкого, непосредственного очага инфекции при аэрозольном заражении, а также клеток примыкающей к легкому плевральной полости. Мы сравнили фенотипы В-клеток незараженных животных, а также в начале и на пике формирования В-фолликулов, т.е. через 3 и 7 недель после заражения.

Как показано на Рисунке 16, примерно 85% популяции В-лимфоцитов легкого составляют клетки с фенотипом CD19⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi}, тогда как 15% составляют клетки с фенотипом CD19⁺B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}, характерного для популяций В-клеток В2 и В1, соответственно. Далее мы более детально охарактеризовали эти клетки. Как и ожидалось лимфоциты В1 не имели характерных для клеток В2 маркеров CD23 и CD21/35, но экспрессировали характерные для этой популяции рецепторы CD43 и CD11b, а также CD5, экспрессирующийся на лимфоцитах В1а (Рисунок 16Б). Таким образом минорную популяцию клеток легкого составляют популяции В1а (B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23⁻CD5⁺) и В1b (B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}CD23⁻CD5⁻).

В плевральной полости незараженных животных популяция В-лимфоцитов представлена преимущественно клетками В1 (Рисунок 16А, Б). Однако после инфицирования доля минорной популяции В2 возрастает с 25 до 60%.

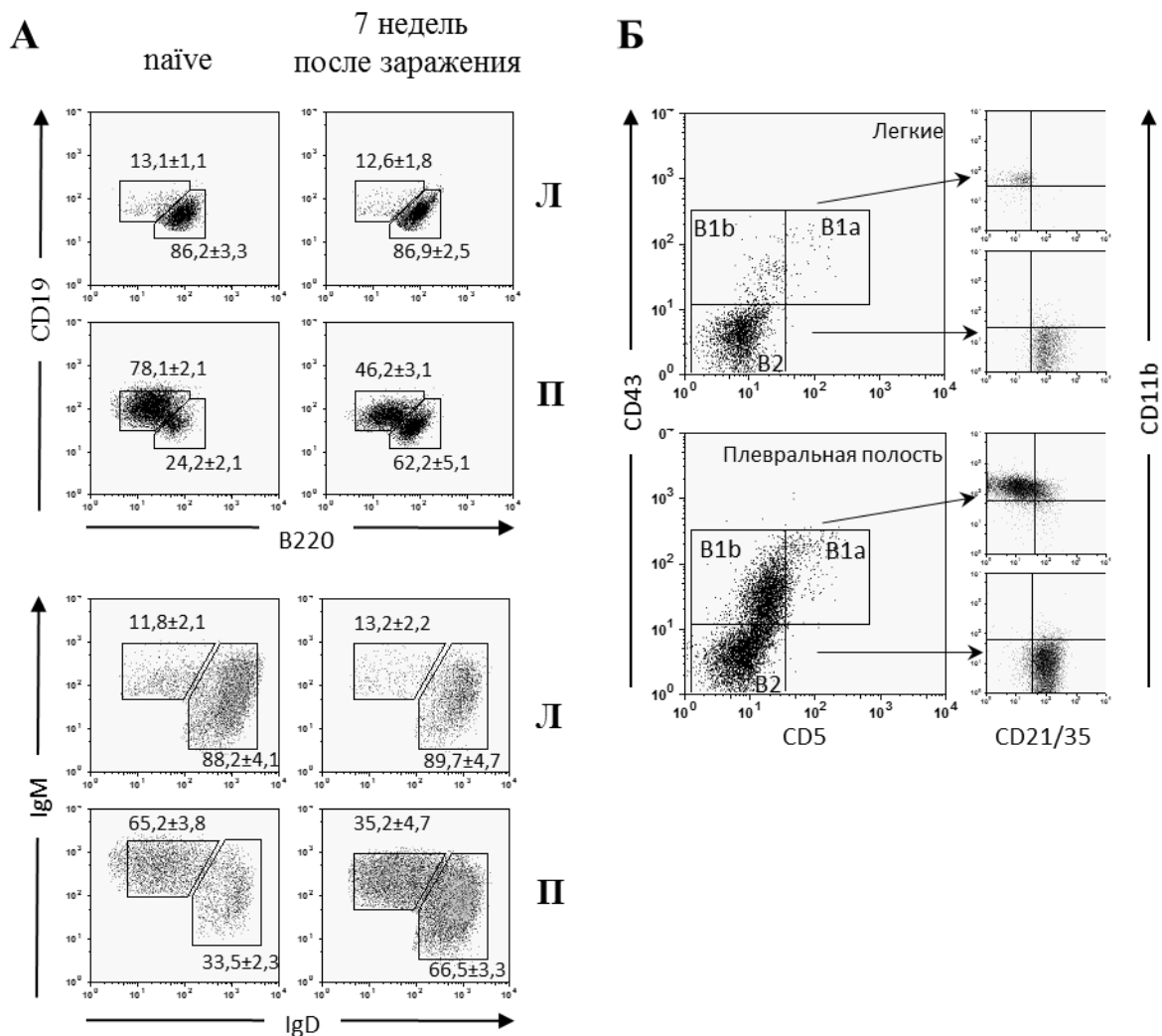


Рисунок 16. Поверхностный фенотип В-лимфоцитов легких и плевральной полости при туберкулезе. **А** – Большая часть популяции В-лимфоцитов легких имеет фенотип $CD19^+B220^+IgM^{lo}IgD^{hi}$, соответствующий классическим лимфоцитам В2, и она сохраняется после инфицирования. Большая часть В-лимфоцитов в плевральной полости интактных животных представлена В-лимфоцитами В1 $CD19^+B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}$. Заражение ТБ приводит к значительному притоку в плевральную полость лимфоцитов В2 (правые панели). **Б** – лимфоциты В2 экспрессируют характерный для них маркер CD21/35, но не маркеры клеток В1 CD11b, CD43, CD5. В-лимфоциты плевральной полости зараженных животных представлены преимущественно клетками В1b ($CD43^+CD5^-CD21/35^-CD11b^+$) и В2 ($CD43^-CD5^-CD21/35^+CD11b^-$). Анализ методом проточной цитофлуориметрии. Представлены репрезентивные данные одного из трех независимых экспериментов.

Одним из маркеров популяции В2-клеток является CD23 – низкоаффинный рецептор к Fc фрагменту IgE [Hardy R.R., Hayakawa K., 2001]. В нашем исследовании, при определении поверхностного фенотипа В-лимфоцитов, мигрирующих в легкие при ТБ, мы показали, что не все В-лимфоциты CD19⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi} имеют на своей поверхности рецептор CD23 (Рисунок 17), а кроме того, уровень его экспрессии не одинаков у разных линий мышей. Уровень CD23 на В2-клетках IgM^{lo}IgD^{hi} выше у мышей В6, по сравнению с I/St (Рисунок 17) и практически отсутствует у мышей линии СВА (данные не приведены), обладающей промежуточной чувствительностью к туберкулезу. Причины таких различий могут быть разные. Во-первых, это могут быть межлинейные различия, обусловленные генетическими особенностями. Действительно, оказалось, что уровень экспрессии CD23 на В-клетках селезенки CD19⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi} интактных мышей В6 выше, чем у I/St. Кроме того, есть данные, что экспрессия CD23 зависит от степени активации В-лимфоцитов. Мы оценили экспрессию CD23 на В-лимфоцитах легких и плевральной полости в комбинации с активационными маркерами CD69 и CD80. Оказалось, что большая часть клеток B220⁺CD23⁺ не экспрессируют CD80, а большинство клеток B220⁺CD80⁺ не имеют CD23 (Рисунок 17Б). В отличие от легочных В-лимфоцитов, клетки В2 плевральной полости незараженных животных экспрессируют маркер CD23 на высоком уровне, так же как фолликулярные В-клетки селезенки (Рисунок 17А). Однако, по мере развития инфекции и активации лимфоцитов уровень CD23 на плевральных лимфоцитах В2 снижается. Вместе с тем число плазматических клеток CD138⁺ в легких и плевральной полости мышей обеих линий не превышает 3% (Рисунок 17В).

4.2.4. Иммунологические характеристики легочных В-лимфоцитов

Поскольку мы обнаружили, что большая часть В-лимфоцитов легких по поверхностному фенотипу схожи с классическими лимфоцитами В2, мы предположили, что их функциональная активность может быть сходна с В-лимфоцитами лимфоидных органов. Мы оценили способность легочных В-клеток продуцировать специфические антитела, основные про- и противовоспалительные

Оценка экспрессии антигенпрезентирующих молекул МНС класса II поверхности легочных В-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии у наивных животных и через 7 недель после заражения туберкулезом выявила, что уровень МНСII увеличивается по мере развития инфекционного процесса, достигая уровня экспрессии на В-клетках селезенки (Рисунок 18 А). Кроме того, обогащенные легочные В-клетки, выделенные из инфицированных легких мышей I/St, так же эффективно, как В-клетки селезенки, презентуют антигены микобактерий специфичным к ним Т-лимфоцитам CD4⁺ и активируют их пролиферацию *in vitro* (Рисунок 18 Б).

Мы также культивировали В-лимфоциты, выделенные из инфицированного легкого чувствительных мышей I/St, с или без добавления микобактериальных АГ в течение 48 часов *in vitro*. Методом ELISA мы детектировали, что легочные В-клетки секретируют большое количество провоспалительного цитокина IL-6 и умеренное количество IL-11, (Рисунок 18 В), и уровень их продукции не зависит от присутствия антигена в культуре. Примечательно, что В-лимфоциты селезенки не продуцировали ни IL-6, ни IL-11 (Рисунок 18 Г), несмотря на высокое содержание микобактерий в селезенке на этом сроке [Nikonenko V., et al., 2000]. Нам не удалось выявить продукцию основных цитокинов 1-ого типа (TNF- α и IFN- γ) и 2-ого типа (IL-10 и TGF- β) В-клетками легких методом ELISA, поскольку их уровень был ниже чувствительности используемого метода. Тем не менее, с помощью внутриклеточной окраски специфическими мАТ и проточной цитометрии удалось выявить, что В-лимфоциты легких зараженных ТБ мышей линий В6 и I/St продуцируют TNF- α , но не IFN- γ (Рисунок 18 Д).

Кроме того, мы оценили уровень и специфичность продукции иммуноглобулинов методом ELISA. Легочные В-лимфоциты мышей I/St секретируют антитела всех подклассов, кроме IgM и IgE. Интересно, что мы не обнаружили реактивности этих антител с антигенами микобактерий или экстрактом здоровой легочной ткани, хотя наблюдалась слабая реактивность IgA и IgG1 с экстрактом, полученным из зараженного легкого (Таблица 1).

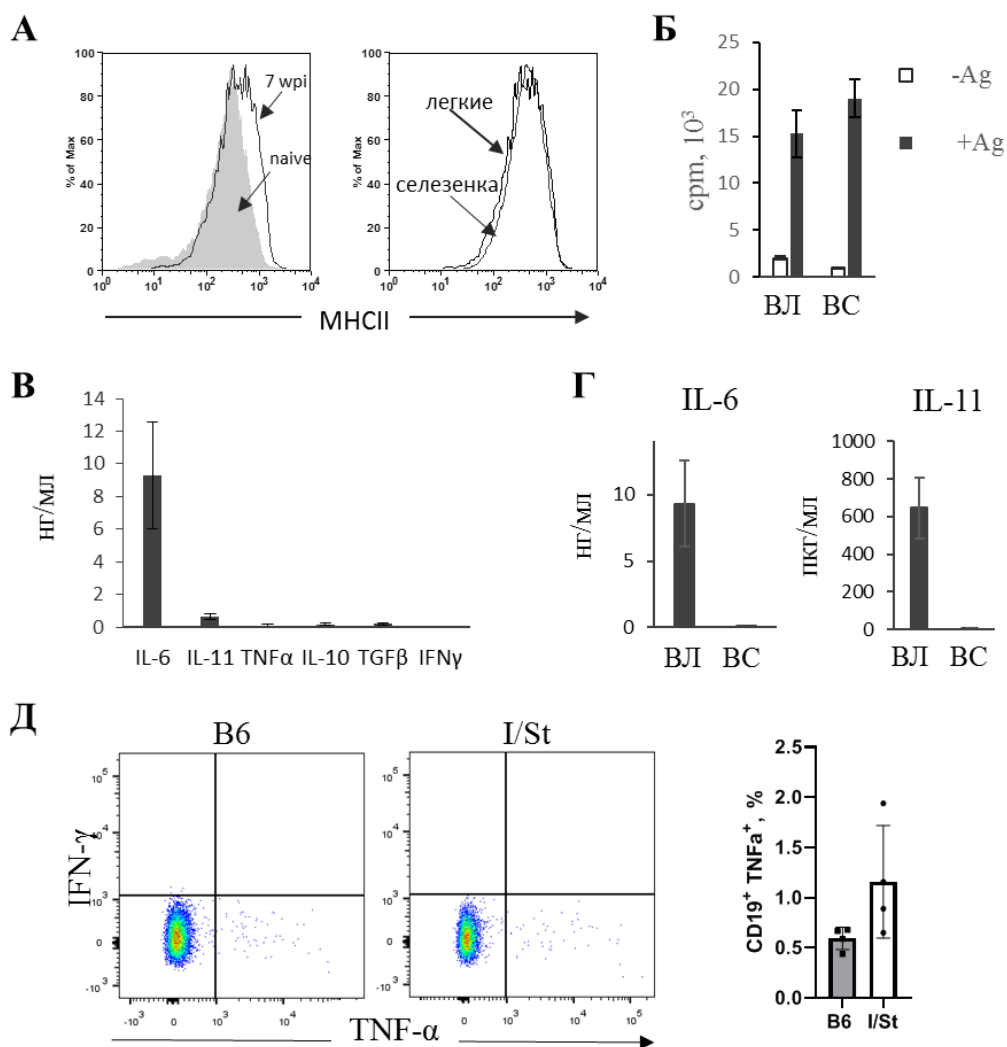


Рисунок 18. А – Оценка экспрессия молекул МНСII (мАТ анти-IАр) на поверхности легочных В-лимфоцитов ($CD19^+$) методом проточной цитофлуориметрии. Б – Оценка пролиферации специфических Т-линий в ответ на презентацию мАГ очищенными В-лимфоцитами легких (ВЛ) и селезенки (ВС) зараженных мышей I/St. Оценка по включению $[^3H]$ -тимидина через 36 ч после совместной культивации *in vitro* с или без добавления антигенов микобактерий (10 мкг/мл). В – Продукция цитокинов легочными В-лимфоцитами от зараженных мышей I/St. Оценка методом ELISA. Г – Оценка продукции IL-6 и IL-11 В-клетками легких (ВЛ) и селезенки (ВС). В, Г – Результаты теста ELISA представлены в виде средних \pm SD. Д – Оценка продукции цитокинов IFN- γ и TNF- α легочными В-клетками мышей B6 и I/St методом проточной цитофлуориметрии по внутриклеточному окрашиванию мАТ. Представлены результаты одного из двух независимых экспериментов. Б-Д, среднее \pm SD, 3-5 мышей в группе.

Таблица 1. Продукция иммуноглобулинов легочными В-лимфоцитами мышей I/St.

Реактивность	Классы иммуноглобулинов						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgE
Общее количество	0.71 ± 0.02*	1.06 ± 0.01	0.48 ± 0.03	1.05 ± 0.00	0.18 ± 0.02	<0.1	<0.1
Соникат микобактерий	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NT	NT
Культуральный фильтрат (КФ) микобактерий	0.06 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NT	NT
Экстракт легочной ткани	0.13 ± 0.08	0.09 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	NT	NT

* Результаты представлены, как средняя оптическая плотность (OD) ± SD, полученные в триплетах лунок в двух независимых экспериментах

4.2.5. Определение специфичности моноклональных АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами

Данные, полученные методом ELISA, свидетельствуют о том, что большая часть АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами мышей I/St, не имеют специфичности к микобактериальным антигенам. Тем не менее, мы решили проверить, существуют ли вообще внутри В-фолликулов клетки, способные продуцировать АТ, специфичные к антигенам микобактерий или ткани легкого. Для этого была создана панель гибридом путем слияния выделенных из инфицированного легкого В-клеток с клетками миеломы. Всего из 288 лунок было получено 66 пролиферирующих клонов, 26 из которых продуцировали АТ.

Как показано, в Таблице 2 пять гибридом продуцировали АТ, распознающие смесь антигенов микобактерий. Еще два антитела реагировали с антигенами экстракта, полученного из инфицированного легкого. При этом большая часть гибридом продуцировала АТ, не имеющие специфичности ни к микобактериям, ни к собственным антигенам (11 IgM, 8 IgG2a и 2 IgG1).

Таблица 2. Реактивность специфичных к микобактериям моноклональных антител, полученных из легочных В-клеток зараженных мышей I/St.

Клон	Изотип АТ	Антиген		
		КФ + соникат	Экстракт легочной ткани, НИ ^а	Экстракт легочной ткани, И ^б
1D1	IgG2b	0.18 ± 0.02*	- **	-
1F3	IgG1	0.22 ± 0.02	-	0.20 ± 0.03
1H10	IgG2a	0.25 ± 0.03	-	0.11 ± 0.01
2H8	IgG2b	0.58 ± 0.06	-	-
3F2	IgG2a	0.20 ± 0.02	-	-

* Результаты представлены, как средняя оптическая плотность (OD) ± SD, полученные в триплетах лунок в двух независимых экспериментах

** OD < 0.1

^а не инфицированные мыши

^б инфицированные мыши

4.2.6. Различные изотипы иммуноглобулинов участвуют в иммунном ответе у чувствительных и резистентных к ТБ мышей

Исходя из полученных данных о низкой продукции специфичных к микобактериальным АГ иммуноглобулинов легочными В-клетками мышей I/St, мы также провели сопоставление последовательностей CDR3 IGH легочных В-лимфоцитов устойчивой и чувствительной линий В6 и I/St, соответственно, извлеченных из данных анализа RNA-seq. Для этого мы выделили В-клетки из легочной ткани с помощью магнитных бус против CD19 через 8 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. Из очищенных В-лимфоцитов была выделена РНК и проведен транскриптомный анализ. Используя MiXCR [Bolotin D. A., et al., 2015], мы извлекли репертуары IGH CDR3 из данных секвенирования РНК

и оценили количество и фракции изотипов в образцах из каждой группы мышей. Мы обнаружили, что уровни экспрессии IgM и IgG были выше в транскриптомных данных от мышей I/St по сравнению с мышами B6 (Рисунок 19 А). В репертуарах IGH легочных В-лимфоцитов I/St доминирующим изотипом иммуноглобулинов был IgG, тогда как в извлеченных репертуарах мышей B6 преобладал IgA (Рисунок 19 Б). При этом IgG2 был основным подклассом IgG в В-клетках обеих линий. Поскольку константная область тяжелой цепи IgG2 кодируется Ighg2c у мышей B6 и Ighg2a у мышей I/St, белки IgG2c и IgG2a функционально сходны, вследствие

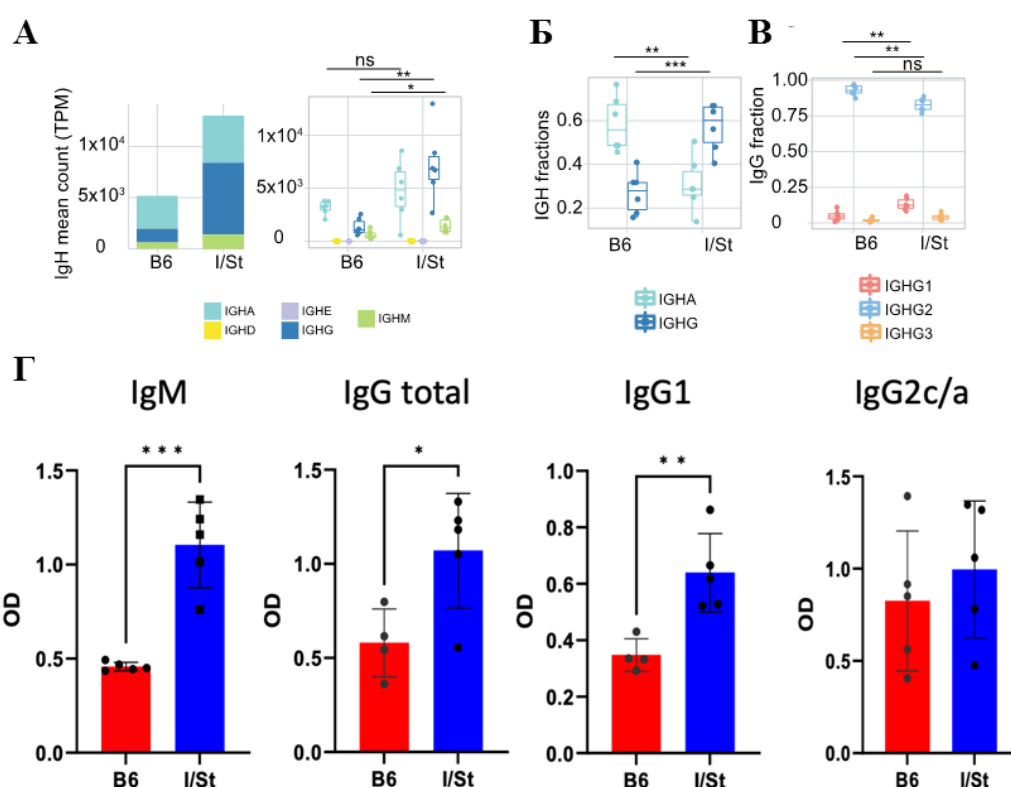


Рисунок 19. А – Сопоставление уровня транскриптов IGH, нормализованное по общему количеству транскриптов и разбитое по изотипам. Б – Частота IgG и IgA в репертуаре IGH. В – частота IgG1, IgG2, IgG3 в репертуаре IgG у мышей B6 и I/St (N = 6 каждой линии). Разницу между группами оценивали с помощью t-критерия, скорректированного с помощью процедуры BH. Г – Уровень специфичных к микобактериальным антигенам АТ в сыворотке крови этих же животных, измеренных методом ELISA. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$. Приведены данные одного из двух независимых экспериментов, 4-5 мышей в группе.

чего их сопоставление адекватно. Мы наблюдали более значимую фракцию IgG1 в репертуаре IGHG мышей I/St по сравнению с мышами B6 (Рисунок 19 В). Интересно, что более высокие уровни экспрессии генов для IgM и IgG в В-клетках мышей I/St соотносились со значимо большей концентрацией Mtb-специфичных АТ IgG и IgM в сыворотке крови этих же животных, по сравнению с мышами B6 (Рисунок 19 Г). Мы полагаем, что более высокий уровень IgM через 8 недель после заражения мышей может указывать на отсроченный или отвлеченный гуморальный ответ на микобактериальные АГ в мышах I/St по сравнению с B6.

4.2.7. Крупные кластеры клонотипа IgA в репертуаре указывают на прогрессирующий иммунный ответ у устойчивых к ТБ мышей B6

Далее мы оценили количество уникальных нуклеотидных последовательностей районов CDR3, которые кодируют идентичные аминокислотные последовательности, что указывает на конвергентность ответа иммуноглобулинов. В данном случае профилирования иммуноглобулинов этот показатель отражает активность реакций соматических гипермутаций. Примечательно, что этот показатель был значительно выше в репертуаре IgA, но не в репертуаре IgG мышей B6 по сравнению с мышами I/St (Рисунок 20 А). Далее мы провели кластерный анализ и оценили 20 самых крупных кластеров среди выявленных. Оказалось, что в В-клетки B6 образуют крупные кластеры IGH с высокой плотностью (по существу представляющих линии образования В-клеток), которые преимущественно включают клонотипы IgA (Рисунок 20 Б). Напротив, клонотипы IGH мышей I/St образовывали значительно меньшие кластеры, состоящие в основном из иммуноглобулинов изотипа IgM (Рисунок 20 Б). Эти данные указывают в том числе на управляемую антигеном IgA эволюцию репертуара BCR в легочных В-лимфоцитах мышей B6, тогда как В-клетки мышей I/St, скорее всего, были неспособны генерировать целенаправленный и защитный иммунный ответ, что соотносится с данными полученными в ELISA и при анализе гибридом.

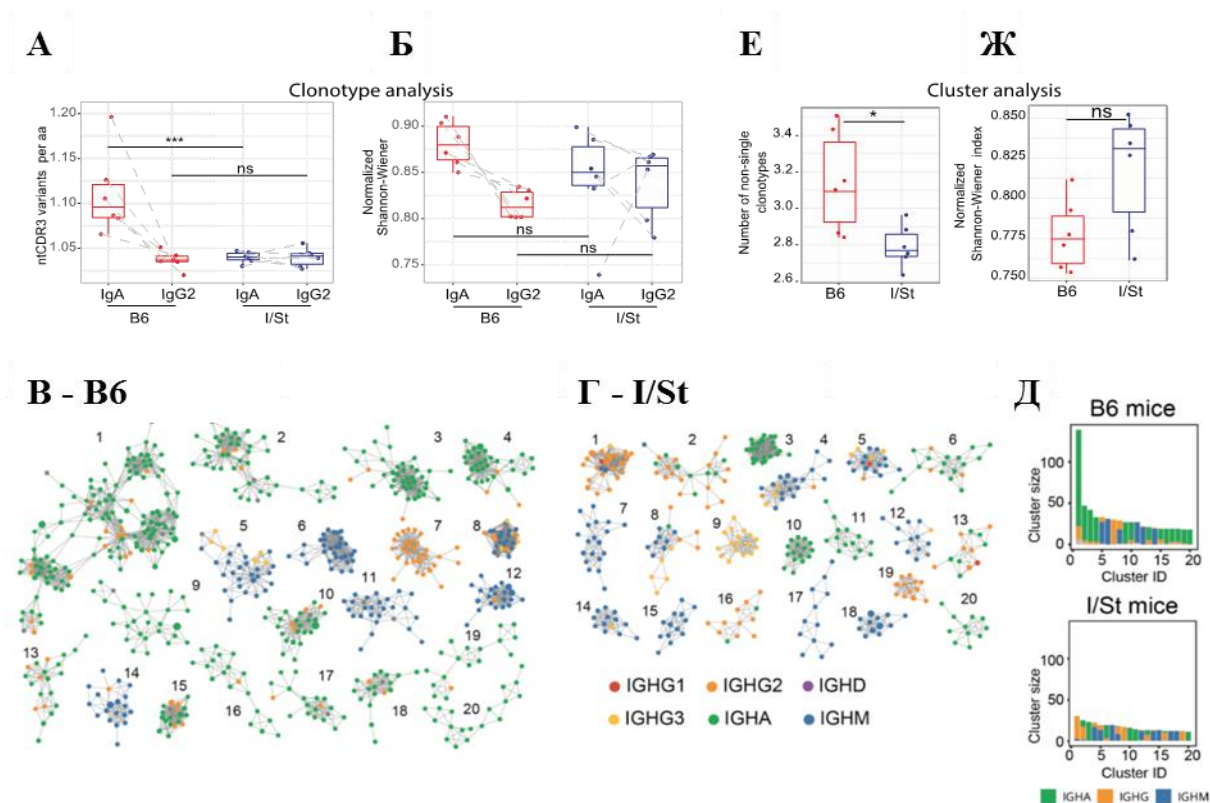


Рисунок 20. Профилирование репертуара BCR и кластерный анализ легочных В-клеток CD19⁺ мышей I/St и B6. **А** – Среднее количество уникальных нуклеотидных последовательностей CDR3 на 1 аминокислотную последовательность, рассчитанное для 330 лучших функциональных клонотипов из клоносета каждого изотипа для каждой мыши. **Б** – Равномерность распределения размеров клонотипов, оцененная с помощью нормализованного индекса Шеннона-Винера. Точки данных, изображающие IgA и IgG2 от одной и той же мыши, связаны пунктирными линиями. N = 6 для каждой группы мышей. Для А и Б различия между группами были проверены с использованием критерия Уилкоксона, скорректированного с помощью процедуры ВН. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,005$. **В, Г** – Для каждой группы мышей были собраны 3000 лучших клонотипов (по количеству прочтений) из каждого репертуара IGH. Показаны 20 крупнейших кластеров клонотипов IGH для мышей B6 (В) и I/St (Г). Каждый узел представляет клонотип в объединенном репертуаре, а узлы окрашены в соответствии с изотипом. **Д** – Распределение клонотипов в 20 крупнейших кластерах, изображенных на панелях В и Г. **Е** – Среднее количество клонотипов в кластерах, содержащих два или более клонотипов. **Ж** – Равномерность совокупного размера клонотипа (т.е. количества чтений) в каждом кластере, оцененная с помощью нормализованного индекса Шеннона-Винера. Для расчета были использованы 3000 лучших функциональных клонотипов IGH от каждой мыши.

4.2.8. TNF- α , продуцируемый В-лимфоцитами, необходим для формирования В-фолликулов, но не влияет на чувствительность мышей к микобактериям

TNF- α – один из ключевых цитокинов в иммунном ответе против микобактерий на разных этапах развития инфекционного процесса [Russell D.G., 2007]. TNF- α крайне необходим для формирования и поддержания структуры гранулем, разрушение которых приводит к диссеминации бактерий [Rook G.A.W., and Hernandez-Pando R., 1996]. Показано, что анти-TNF- α терапия больных ревматоидным артритом или болезнью Крона иногда приводит к реактивации туберкулеза, латентными бессимптомными носителями которого были пациенты [Kean J., et al., 2005]. В моделях на мышах показано, что полный нокаут гена *tnfa* приводит к тому, что такие животные не могут контролировать инфекцию [Flynn J.L., et al., 1995, Jacobs M., et al., 2000]. Избирательное выключение гена *tnfa* только в Т-клетках не влияет на течение туберкулеза в острой фазе, но критичен в хронической стадии развития инфекционного процесса. Если же TNF- α не производится ни макрофагами, ни нейтрофилами, то это критично на начальных стадиях формирования иммунного ответа. И, наконец, если ген *tnfa* выключен и в Т-лимфоцитах, и в миелоидных клетках, то такие мыши сравнимы с животными с полным нокаутом этого гена [Allie N., et al., 2013]. В работе Phuah J. с соавторами было показано, что легочные В-лимфоциты приматов в не очень больших количествах, но продуцируют TNF- α [Phuah J., et al., 2016]. Мы также детектировали, что примерно 0,5-1% легочных В-клеток мышей В6 и I/St секретируют этот цитокин. Показано, что продуцируемый В-клетками TNF- α необходим для правильной организации вторичных лимфоидных органов [Tumanov A.V., et al., 2010]. В связи с этим мы решили оценить вклад этого цитокина, секретируемого В-клетками, в формирование В-фолликулов в легких и чувствительность к *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Для этого мы использовали мышей со специфически выключенным геном *tnfa* в В-лимфоцитах (В6.CD19^{cre+/-}TNF α ^{fllox/fllox}, далее В-TNF-KO), а также мышей дикого типа В6. Мы оценили степень формирования В-фолликулов в легких

исследуемых животных через 9 и 16 недель после аэрозольного заражения микобактериями *M. tuberculosis* и *M. avium*, соответственно. Мы показали, что в отсутствие TNF- α , продуцируемого В-лимфоцитами, в легких образуется меньше В-фолликулов при заражении туберкулезом (Рисунок 21 А, Б), а при заражении *M. avium* этот цитокин оказался критическим для формирования В-фолликулов (Рисунок 21В, Г).

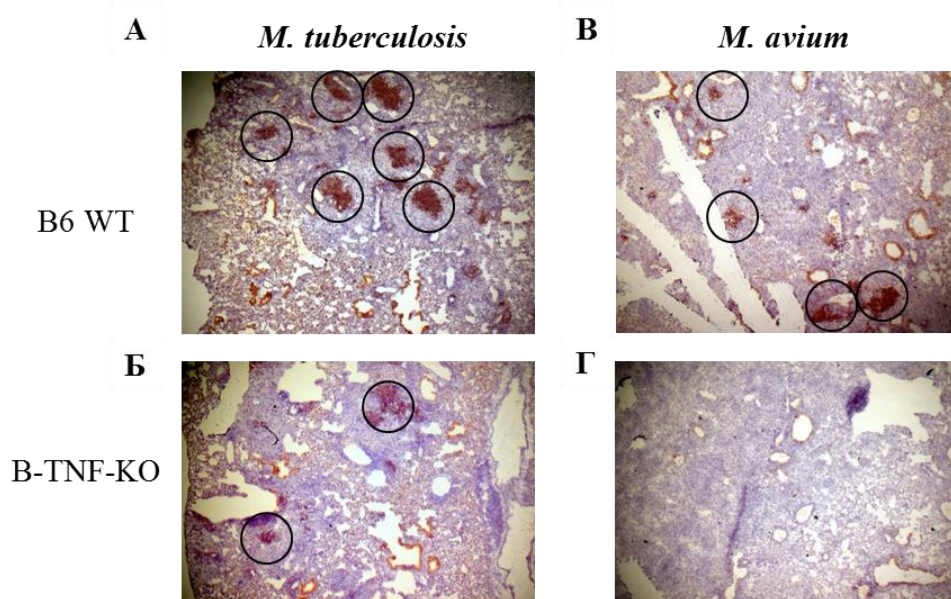


Рисунок 21. ИГХ окрашивание криопрепаратов легкого мышей дикого типа (WT) В6 и с дефицитом TNF в В-клетках (B-TNF-KO) после заражения *M. tuberculosis* (А, Б) и *M. avium* (В, Г). Окраска антителами анти-CD19 (коричневый) с контрастным окрашиванием гематоксилином. Увеличение $\times 20$.

Мы также проверили, повлияет ли отсутствие TNF- α , продуцируемого В-клетками, на такие важные показатели устойчивости, как способность сдерживать рост инфекции в органах и продолжительность жизни зараженных животных. Несмотря на важность при туберкулезе TNF- α , продуцируемого Т-лимфоцитами и миелоидными клетками, секреция TNF- α В-лимфоцитами не влияла на способность животных контролировать размножение бактерий в легких и селезенке (Рисунок 22 А, Б, Г, Д), а также не влияла на продолжительность их жизни (Рисунок 22 В, Е) ни при заражении микобактериями *M. tuberculosis* (верхние панели), ни *M. avium* (нижние панели).

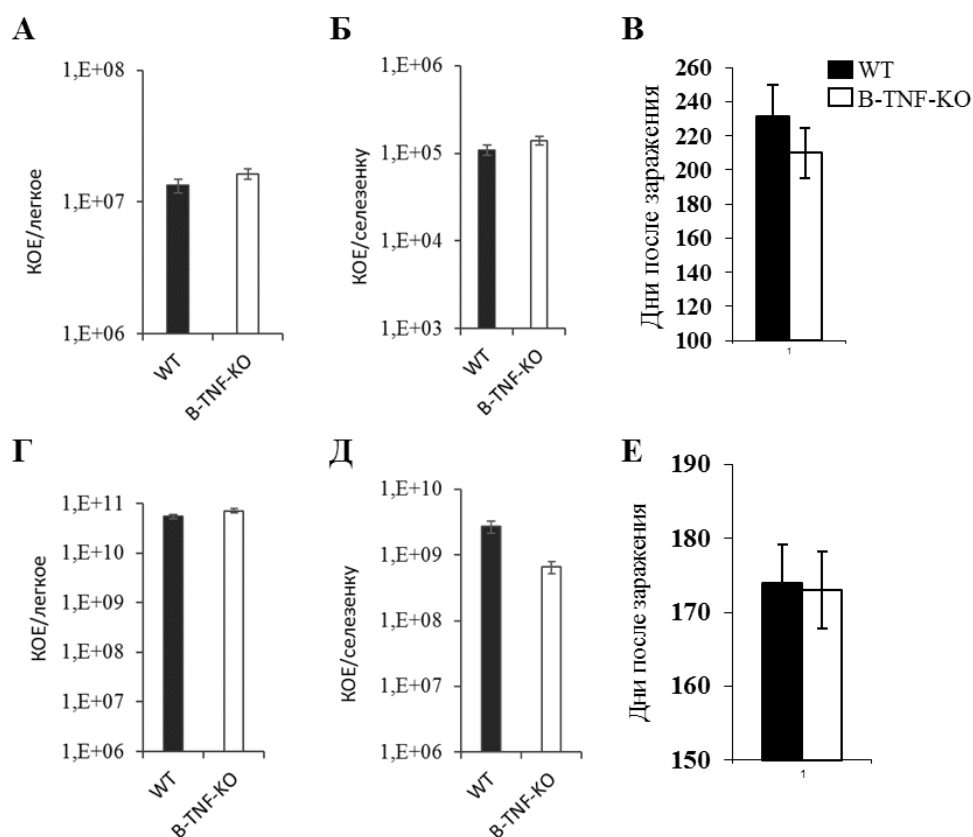


Рисунок 22. Оценка числа микобактерий в легких (А, Г) и селезенке (Б, Д) в мышах дикого типа В6 (WT) и В-TNF-KO после заражения *M. tuberculosis* (А, Б) или *M. avium* (Г, Д). В, Е – Продолжительность жизни зараженных *M. tuberculosis* (В) или *M. avium* (Е) животных представлена как среднее время выживания \pm SD, 3-5 мышей в группе. Достоверных отличий между группами не обнаружено.

4.2.9. Дефицит IL-6, продуцируемого В-клетками, приводит к повышению чувствительности к ТБ

Как описано выше, мы зафиксировали высокую продукцию IL-6 легочными В-лимфоцитами мышей I/St при ТБ. Похожие данные были получены и Benard с соавторами при изучении устойчивых мышей В6 и пациентов с ТБ [Bénard A., et al., 2018], а также в экспериментах на макаках [Phuah J., et al., 2016]. Кроме того, в последней работе показано, что удаление В-лимфоцитов до заражения приводило к снижению общей продукции IL-6 в инфицированном легком [Phuah J., et al., 2016]. IL-6 – цитокин, обладающий множественными эффектами на разные окружающие клетки. Показано, что системный нокаут гена *il6* приводит к

ухудшению контроля туберкулезной инфекции, что сопровождается сниженной продукцией IFN- γ на ранних сроках инфекционного процесса, а также увеличению продукции IL-12 и TNF- α [Ladel C.H., et al., 1997, Saunders B. M., et al., 2000]. IL-6, продуцируемый инфицированными макрофагами, снижает чувствительность к IFN- γ неинфицированных макрофагов, а также экспрессию молекул МНС класса II на этих клетках [Nagabhushanam V., et al., 2003]. IL-6 также имеет провоспалительную функцию, стимулируя продукцию хемоаттрактанта нейтрофилов IL-17 [Acosta-Rodriguez E.V., et al., 2007]. Вместе с тем, IL-6 необходим для дифференцировки фолликулярных Т-хелперов T_{FH} CXCR5⁺ [Eto D., et al., 2011, Arkatkar T., et al., 2017], играющих важную роль в эффективной активации макрофагов при ТБ [Slight S.R., et al., 2013]. В связи с противоречивостью имеющихся данных о действии IL-6 и тем, что источником этого цитокина могут служить различные клетки, мы решили оценить вклад продуцируемого В-лимфоцитами IL-6 в иммунный ответ и чувствительность к инфекции, вызванной вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

Для этого были выведены мыши B6.CD19cre^{+/+}-IL6^{flox/flox} (далее В-IL-6КО) с кондиционным нокаутом гена *il6* под промотором гена для CD19. У таких животных избирательно выключен ген цитокина IL-6 в В-лимфоцитах. Сначала мы оценили вклад дефицита производимого В-лимфоцитами IL-6 на тяжесть течения туберкулезной инфекции. Продолжительность жизни мышей В-IL-6КО после заражения была достоверно меньше, чем у животных дикого типа (WT) (Рисунок 23 А). Кроме того, ранее не производилась оценка влияния системного нокаута гена *il6* у мышей IL-6КО на продолжительность жизни при аэрозольном заражении низкой дозой *M. tuberculosis* H37Rv, в связи с чем мы оценили и этот показатель. Оказалось, что время жизни мышей IL-6КО достоверно меньше, чем у мышей дикого типа и В-IL-6КО (Рисунок 23 А). При этом мы не обнаружили разницы между мышами В-IL-6КО и мышами дикого типа по количеству микобактерий в органах на исследуемых сроках (Рисунок 23 Б, В). Таким образом мыши В-IL-6КО

обладают промежуточным фенотипом по чувствительности к ТБ при аэрозольном заражении.

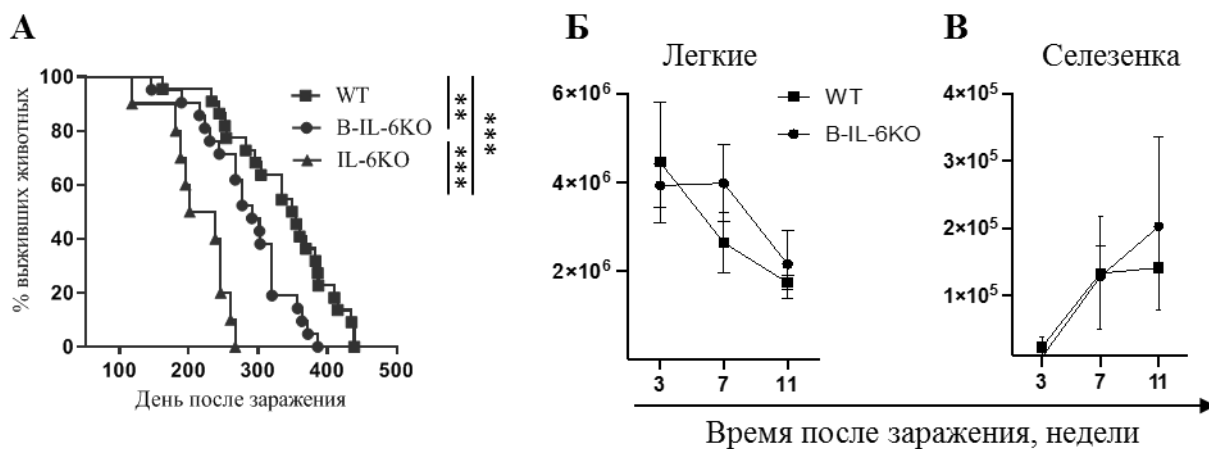


Рисунок 23. Мыши с дефицитом IL-6 в В-лимфоцитах более чувствительны к заражению туберкулезом. **А** – Время жизни мышей IL-6KO, B-IL-6KO и WT. Logrank тест, ** $P=0,0045$; $P < 0,0001$. 10-20 мышей в группе. **Б, В** – Бактериальная нагрузка в легких (Б) и селезенке (В) мышей B-IL-6KO и WT. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов.

4.2.10. Влияние дефицита IL-6, производимого В-клетками, на общий уровень IL-6 в легком при заражении ТБ

Следующим шагом нашего исследования стало выявление причин, по которым отсутствие IL-6 в В-клетках приводит к повышению чувствительности к ТБ. На первом этапе исследований мы определили, как повлияет нарушение продукции IL-6 В-клетками на общий уровень продукции цитокина в легких после инфицирования. Несмотря на то, что через 3 недели после заражения В-лимфоциты в легком составляют примерно 10% от всех клеток легкого (Рисунок 13, Рисунок 24 А), отсутствие продукции IL-6 этими клетками приводит к снижению общего уровня экспрессии гена *il6* более, чем в 10 раз (Рисунок 24 Б). По мере развития инфекционного процесса количество В-лимфоцитов в легком возрастает. При этом общий уровень экспрессии гена *il6* снижается, но соотношение его экспрессии у дефектных мышей и мышей дикого типа сохраняется (Рисунок 24 А, Б). Кроме

того, снижение уровня продукции IL-6 привело и к снижению общего числа В-лимфоцитов в легком через 7 недель после заражения (Рисунок 24 А).

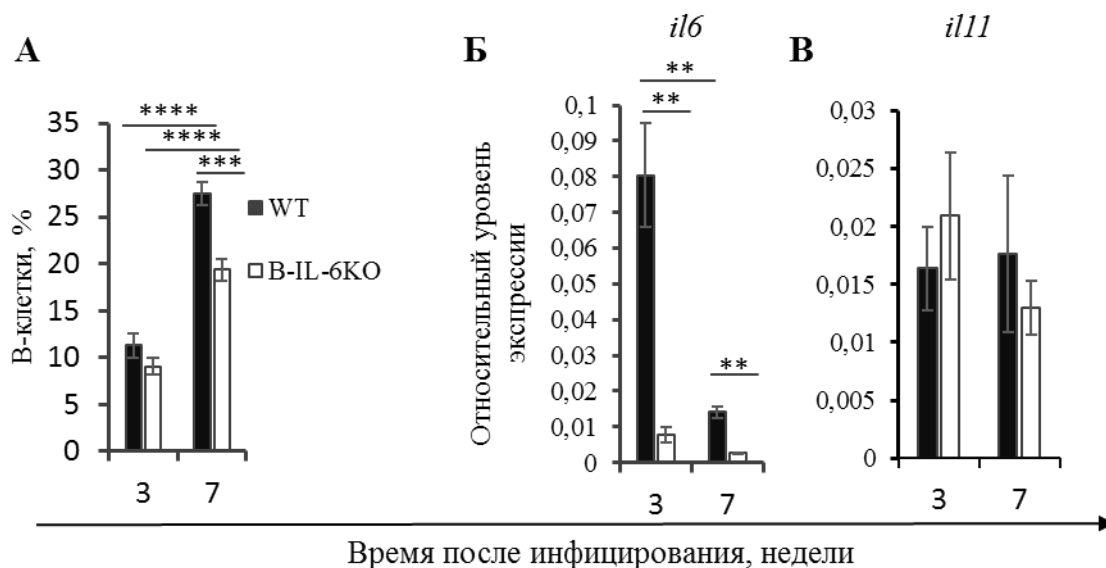


Рисунок 24. Истощение IL-6 в В-лимфоцитах приводит к снижению числа В-клеток и общего уровня экспрессии гена *il6* в легком. **А** – Анализ числа В-лимфоцитов CD19⁺ в легких мышей В-IL-6КО и мышей дикого типа В6 (WT) через 3 и 7 недель после заражения *M. tuberculosis* H37Rv. **Б, В** – Оценка уровня экспрессии генов *il6* (Б) и *il11* (В) в легких мышей В6 (WT) и В-IL-6КО через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения. Анализ экспрессии генов методом qPCR относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе в каждой точке измерений.

Ранее было показано, что *in vivo* блокирование цитокина IL-11 из того же семейства gp130, что и IL-6, приводит к снижению экспрессии гена *il6* и продукции самого цитокина в легких, а также к уменьшению патологии при туберкулезе [Karina M.A., et al., 2011, Shepelkova G., et al., 2016]. В связи с этим мы проверили, снизится ли экспрессия гена *il11*, при блокировании продукции IL-6 В-клетками. Оказалось, что отсутствие продукции IL-6 только В-лимфоцитами не влияет на экспрессию гена *il11* (Рисунок 24 В).

4.2.11. Влияние дефицита IL-6 в В-клетках на функции Т-лимфоцитов

На следующем этапе исследований мы оценили, влияет ли дефект продукции IL-6 лишь В-клетками на специфическую продукцию цитокинов IFN- γ и IL-17, а также на число фолликулярных хелперов T_{FH}CXCR5⁺ и продукцию ими IL-21. Число Т-лимфоцитов CD4⁺ в легких возрастало по мере развития инфекционного процесса, но не различалось между мышами линий В-IL-6КО и WT (Рисунок 25 А). Вместе с тем количество специфических Т-клеток CD4⁺, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами было ниже у мышей дефектной линии через 3 недели после заражения (Рисунок 25 Б), что также соотносилось с общим уровнем экспрессии гена *ifng* в легком на этом сроке (Рисунок 25 В). Через 7 недель после заражения число Т-клеток CD4⁺IFN- γ ⁺ в легком мышей В-IL-6КО возросло и не отличалось от мышей дикого типа. Уровень специфической продукции IL-17 Т-клетками CD4⁺ также возрастал по мере развития инфекционного процесса и был ниже через 3 и 7 недель после заражения у мышей дефектной линии В-IL-6КО по сравнению с контрольными животными В6 (Рисунок 25 Г).

Оценка числа фолликулярных хелперов T_{FH}CXCR5⁺ и продукции характерного для них цитокина IL-21 показала, что число таких клеток у мышей В-IL-6КО снижено в 2 раза в легком и селезенке через 3 и 7 недель после заражения, после чего их количество сравнивается с мышами дикого типа (Рисунок 26 А, Б). Стоит отметить, что в селезенке и наивных мышей В-IL-6К, и IL-6КО число лимфоцитов T_{FH}CXCR5⁺ было также в 2 раза ниже, чем у мышей дикого типа (Рисунок 26 В). Экспрессия гена *Il21*, кодирующего характерный для фолликулярных Т-хелперов цитокин IL-21, в легких мышей В-IL-6КО также снижена по сравнению с мышами дикого типа В6 через 3 недели после заражения (Рисунок 26 Г), после чего, видимо, влияние продукции IL-6 В-клетками компенсируется другими источниками и/или другими цитокинами.

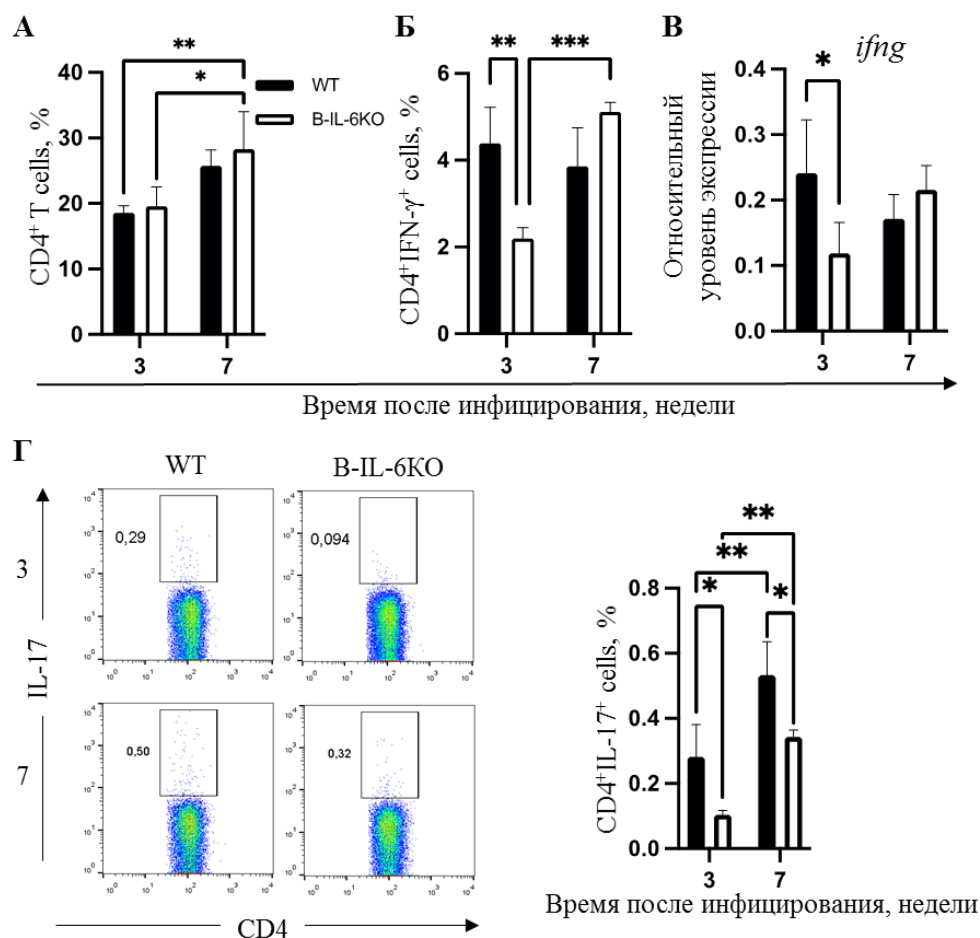


Рисунок 25. А – Относительное количество Т-клеток CD4⁺ в легких через 3 и 7 недель после заражения мышей В6(WT) и В-IL-6КО. Б, Г – Анализ числа легочных Т-клеток CD4⁺, специфически продуцирующих IFN- γ (Б) и IL-17 (Г). Внутриклеточное окрашивание МАТ против IFN- γ и IL-17 через 18 ч после культивирования клеток легкого *in vitro* в присутствии сониката микобактерий (10 мкг/мл) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. В – Относительный уровень экспрессии гена *ifng* в легких через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения мышей В6 и В-IL-6КО. Анализ экспрессии генов методом qPCR относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе в каждой точке измерений.

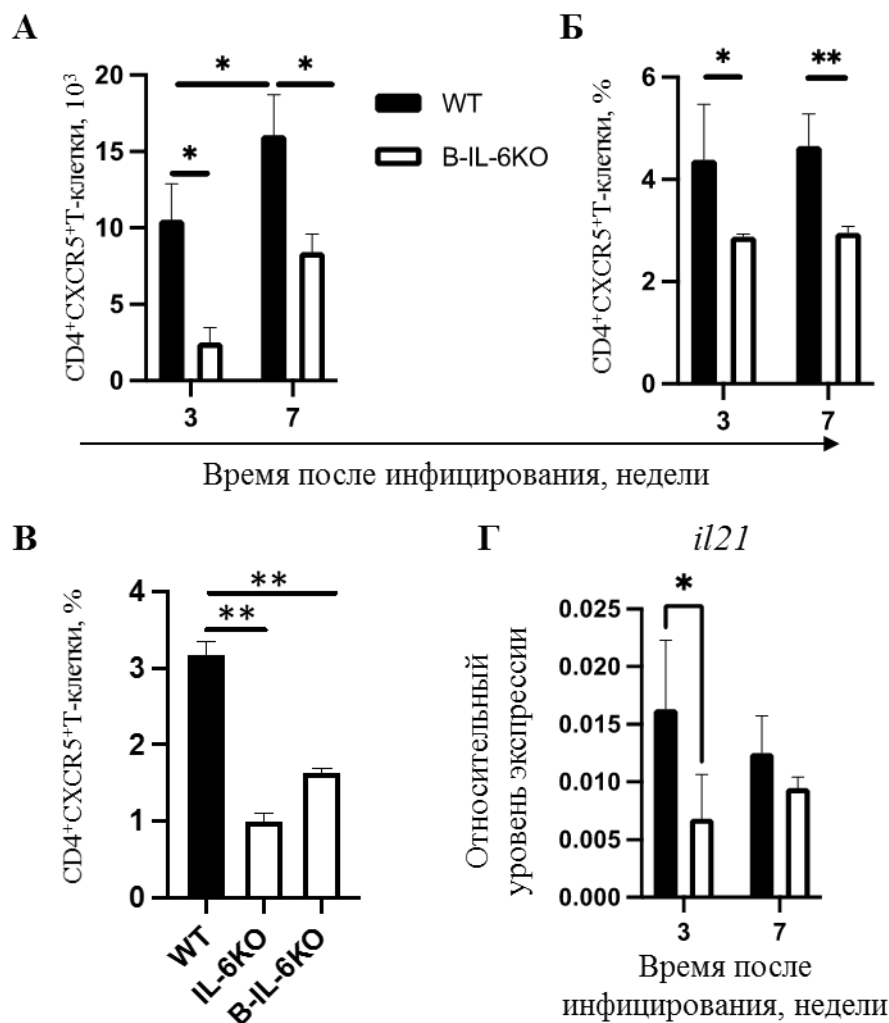


Рисунок 26. Влияние дефицита IL-6 в В-клетках на формирование фолликулярных хелперов T_{fh}CXCR5⁺. **А, Б** – Количество Т-лимфоцитов T_{fh}CD4⁺CXCR5⁺ в легких (А) и селезенке (Б) через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения мышей дикого типа В6 (WT) и с дефицитом IL-6 в В-клетках (B-IL-6KO). **В** – Относительное количество лимфоцитов T_{fh}CD4⁺CXCR5⁺ в селезенке наивных мышей дикого типа (WT), с полным нокаутом IL-6 (IL-6KO) и с дефицитом IL-6 в В-клетках (B-IL-6KO). **Г** – Относительный уровень экспрессии гена *il21* в легких мышей В6 (WT) и B-IL-6KO через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения. Анализ экспрессии генов методом qPCR относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе в каждой точке измерений.

В литературе описана важность фолликулярных Т-хелперов $T_{FH}CXCR5^+$ для формирования эффективного ответа на туберкулезную инфекцию, и, в частности, продукцию $IFN-\gamma$ и индуцибельной NO-синтазы (iNOS), необходимой для синтеза токсичного для микобактерий оксида азота NO. Несмотря на сниженное количество клеток $T_{FH}CXCR5^+$ в легком и селезенке через 3 и 7 недель после заражения и сниженное число Т-лимфоцитов $CD4^+$, специфически продуцирующих $IFN-\gamma$, это не повлияло ни на общее число макрофагов $F4/80^+$ в легких (Рисунок 25А), ни на продукцию iNOS, что видно по экспрессии гена *inos* (Рисунок 27 Б) и по ИГХ окраске криопрепаратов легкого мАТ против iNOS (Рисунок 27 В) мышей дикого типа В6 и В-IL-6КО.

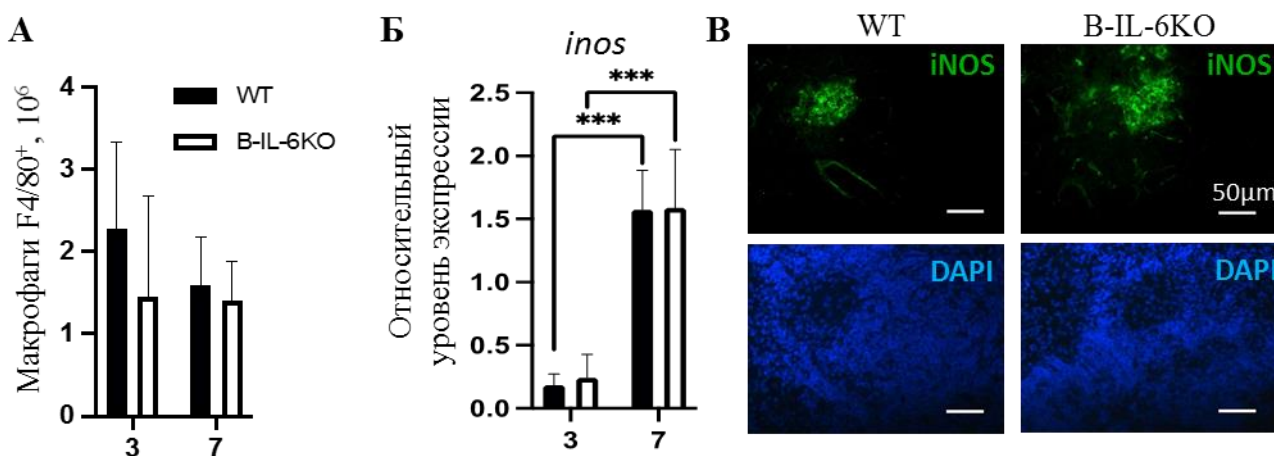


Рисунок 27. А – Анализ числа макрофагов $F4/80^+$ (методом проточной цитофлуориметрии) в легких мышей В6 дикого типа (WT) и с дефицитом IL-6 в В-клетках (B-IL-6KO) через 3 и 7 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. Б – Относительный уровень экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы *inos* в легких мышей В6 (WT) и B-IL-6KO. Анализ экспрессии генов методом qPCR относительно экспрессии гена домашнего хозяйства *hprt*. ** $P < 0,01$. В – ИГХ окраска мАТ против iNOS криопрепаратов легкого мышей WT и B-IL-6KO через 7 недель после заражения. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе в каждой точке измерений.

4.2.12. Скопление В-фолликулов – признак патогенеза или протекции?

4.2.12.1. В-фолликулы при заражении *M. avium*

По многим параметрам патогенез заболевания, вызванного заражением чувствительных к *M. tuberculosis* и *M. avium* линий мышей, похож на патогенез ТБ человека. В частности, и у людей, и у животных образуются некротические гранулемы с гипоксией, а также формируются В-фолликулы в легких [Ulrichs T., et al., 2004, Ulrichs T., et al., 2005, Kondratieva E., et al., 2010, Gonzalez-juarrero M., et al., 2001, Phuah JY, 2012, Slight S.R., et al., 2013]. При этом, если при заражении *M. tuberculosis* разница в образовании В-фолликулов между чувствительными и устойчивыми мышами носит лишь количественный характер, то при заражении *M. avium* у чувствительных мышей В6 обнаруживается множество фолликулов, тогда как у устойчивых мышей I/St их не формируется вовсе – В-клетки рассеяны в ткани легкого, не образуя скоплений [Kondratieva E., et al., 2010]. В связи с этим возник вопрос, является скопление В-фолликулов при инфекции, вызванной *M. avium*, фактором излишнего воспаления и патогенеза или иммунологической протекции.

Поскольку восприимчивость к *M. avium* чувствительной и устойчивой линий В6 и I/St, соответственно, обусловлена экспрессией аллелей s или r гена *slc11a1* [Kondratieva E., et al., 2010], то для ответа на этот вопрос мы провели сегрегационный анализ в мышах F2, полученных скрещиванием указанных родительских линий. Мы оценили общее количество В-фолликулов в легком и площадь, занимаемую ими, сопоставляя эти признаки с расщеплением по гену *slc11a1*. Поскольку ген *slc11a1* экспрессируется исключительно в макрофагах, то число микобактерий в легких служило маркером контроля сдерживания инфекции.

В первой серии экспериментов мы оценили динамику изменения общего числа В-клеток в легких и В-фолликулов у родительской линии В6, поскольку эти показатели могли и не совпадать. Максимальное количество В-клеток в легких обнаруживается через 9-11 недель после заражения (Рисунок 28 А), и на тот же срок выявляется больше всего В-фолликулов (Рисунок 28 Б). Для последующего анализа формирования В-фолликулов мы брали мышей через 9 недель после заражения.

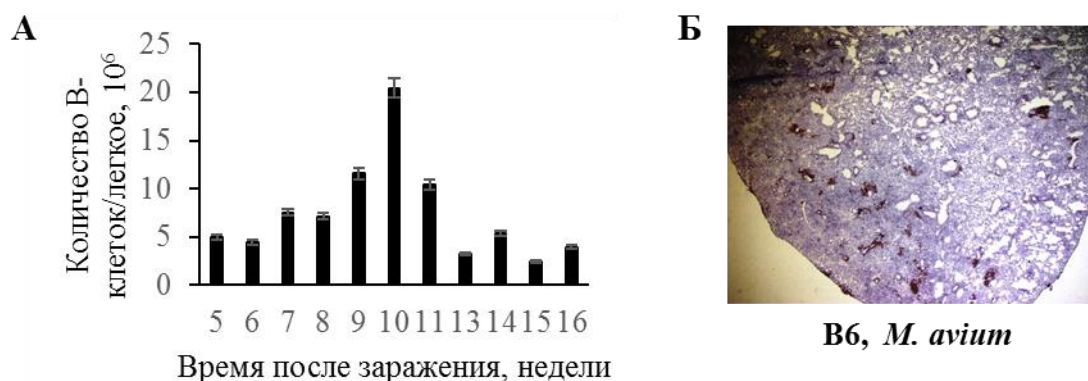


Рисунок 28. **А** – Анализ количества В-клеток CD19⁺ в легких мышей В6 после аэрозольного заражения *M. avium* (10^3 КОЕ/мышь). Оценка методом проточной цитофлуориметрии. Данные представлены в виде средних \pm SD, 3 мыши в группе в каждой точке измерений. **Б** – ИГХ окрашивание криопрепарата легкого мыши В6 через 10 недель после заражения мАТ против CD19 (коричневый), с докрасиванием гематоксилином.

Как и ожидалось, генотип *slc11a1^{s/s}* определял достоверно худшую эффективность контроля размножения микобактерий в легких по сравнению с генотипом *slc11a1^{r/r}* (Рисунок 29 А). При этом даже качественная оценка гистологической картины показала, что у мышей *slc11a1^{s/s}* формировалось больше В-фолликулов (Рисунок 29 Б), чем у мышей с генотипом *slc11a1^{r/r}* (Рисунок 29 В), а количественный анализ (микрометрия) подтвердил, что разница достоверна (Рисунок 29 Г, Д). Кроме того, формирование скоплений В-клеток в легких мышей *Slc11a1^{s/s}* прямо коррелирует с количеством высеваемых бактерий ($r = 0.82$, $P < 0,0001$). Таким образом, мы получили генетическое свидетельство того, что образование В-фолликулов в легких при заражении *M. avium* является фактором патогенеза, а не дополнительным способом защиты от инфекции, а уровень генетической восприимчивости к конкретному виду микобактерий во многом определяет характер легочной патологии, что позволяет считать генетику хозяина важнейшим фактором патогенеза.

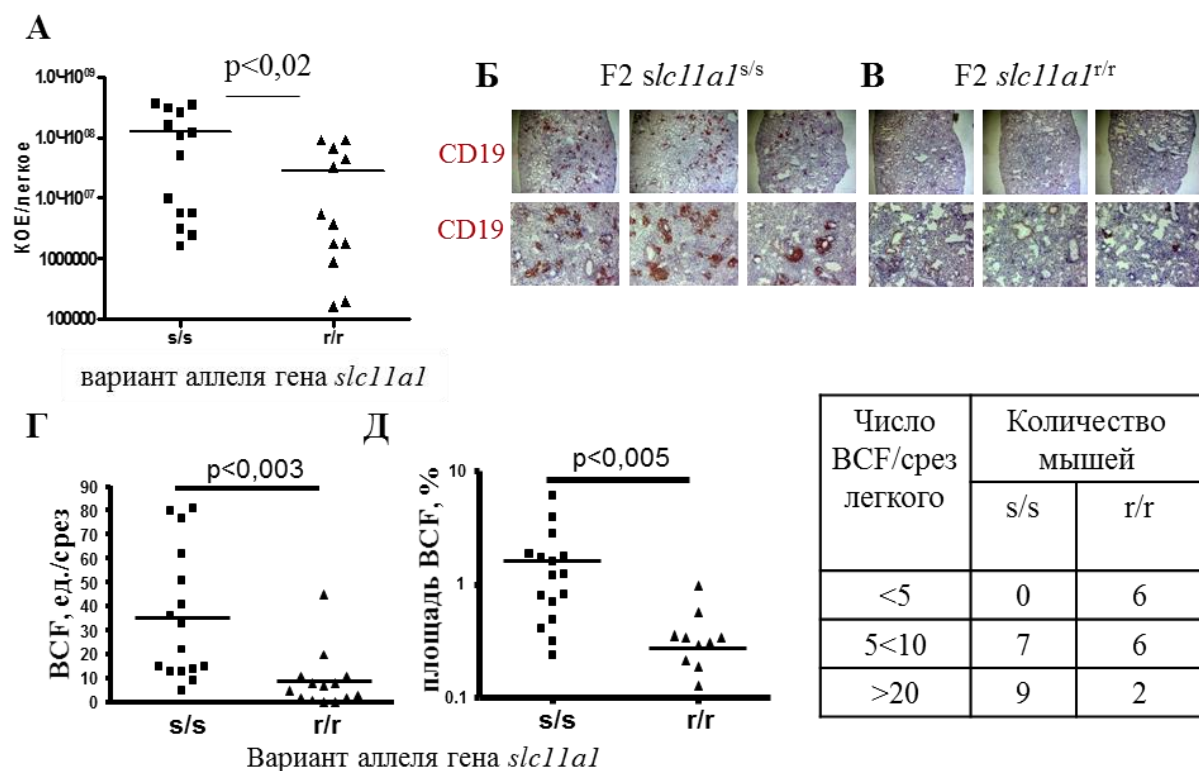


Рисунок 29. Количество В-фолликулов при заражении *M. avium* зависит от экспрессии чувствительного аллеля s гена *slc11a1*. **А** – Бактериальная нагрузка в легких мышей F2(I/StxB6) с генотипом s/s (16 мышей в группе) и *slc11a1* r/r (14 мышей в группе) через 9 недель после аэрозольного заражения *M. avium*. **Б, В** – В-фолликулы в легких мышей F2, *slc11a1* s/s (**Б**) и r/r (**В**) через 9 недель после аэрозольного заражения *M. avium*. ИГХ окраска криопрепаратов легкого мышей МАТ против CD19 (коричневый) с докрасиванием гематоксилином. **Г, Д** – Микрометрический анализ криопрепаратов легкого. Оценка количества (**Г**) и суммарной площади В-фолликулов (BCF) (**Д**) на срез легкого у мышей с генотипом *slc11a1* s/s и r/r через 9 недель после аэрозольного заражения *M. avium*.

4.2.12.2. Фолликулы при *M. tuberculosis* ассоциированы с контролем воспаления

Как сказано выше, характер формирования В-фолликулов у различных по чувствительности мышей при инфицировании *M. tuberculosis* и *M. avium* не одинаков. Если при инфекции, вызванной *M. avium* большее число В-фолликулов

характерно для более чувствительных к инфекции животных, то при *M. tuberculosis* заметное количество В-фолликулов наблюдается у обеих линий мышей на пике воспаления, после чего В-фолликулы рассасываются у мышей чувствительной линии I/St, но сохраняются длительное время в хронической стадии заболевания у мышей устойчивой линии В6 (Рисунок 13, 14 к предыдущим главам). В связи с этим мы решили оценить, насколько ассоциировано общее воспаление в легком с наличием В-фолликулов.

Мы выбрали несколько цитокинов, играющих важную роль при ТБ, и методом ПЦР в реальном времени оценили динамику экспрессии их генов в легких мышей В6 и I/St после заражения ТБ. Мы показали, что для устойчивой линии В6 характерно более быстрое увеличение экспрессии генов цитокинов IL-1 α , IL-1 β и TNF- α в первые недели после инфицирования с последующим снижением экспрессии или поддержанием на том же уровне (Рисунок 30 А, Б, В). При этом уровень экспрессии этих генов у чувствительной линии I/St ниже в первые недели после заражения, однако постепенно нарастает по мере развития инфекционного процесса и в хронической стадии заболевания становится выше, чем у устойчивой линии В6 (Рисунок 30). Экспрессия генов провоспалительных цитокинов IL-11 и IL-17 постоянно нарастает по мере развития инфекционного процесса и становится значимо выше в хронической стадии инфекции у мышей чувствительной линии I/St, чем у устойчивой линии В6 (Рисунок 30 Г, Е).

4.2.13. Удаление В-лимфоцитов у устойчивых мышей В6 в хронической стадии развития ТБ приводит к повышению чувствительности к инфекции

Ранее было показано, что мыши, лишенные В-клеток (В-/-) проявляют повышенную восприимчивость к ТБ, а удаление В-лимфоцитов у макак до и в первые недели после заражения ТБ приводит к нарушению локального Т-клеточного ответа и росту бактериальной нагрузки в легких. Вместе с тем, как отмечено выше, у чувствительных к ТБ мышей I/St по мере развития инфекции наблюдается диссоциация В-фолликулов в легких и истощение пула легочных В-

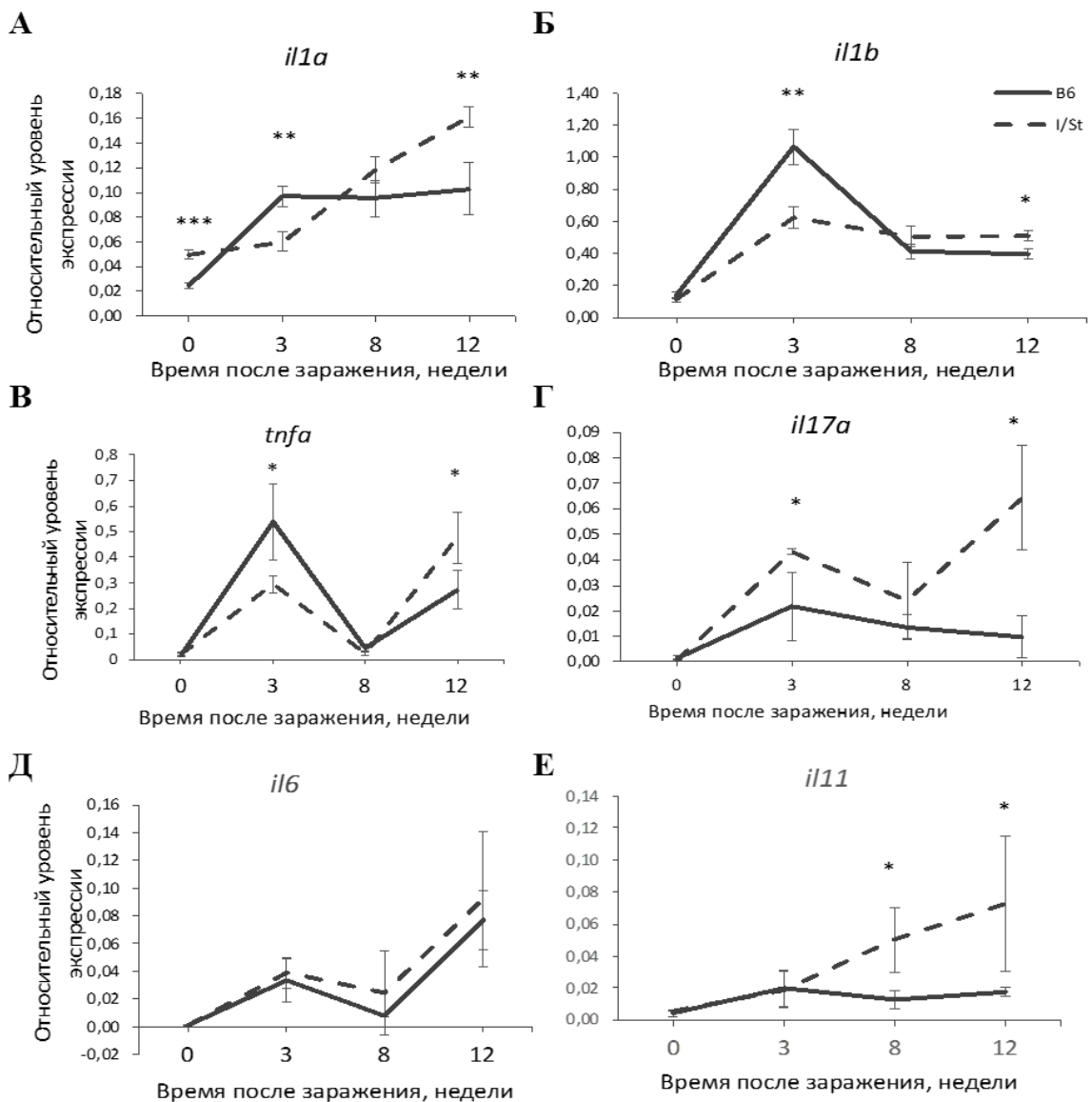


Рисунок 30. Динамика экспрессии генов провоспалительных цитокинов у устойчивых и чувствительных к ТБ мышей В6 и I/St, соответственно, через 3, 8 и 12 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis*. Анализ экспрессии генов некоторых провоспалительных цитокинов в легких мышей В6 и I/St через 3, 8 и 12 недель после аэрозольного заражения *M. tuberculosis* H37Rv. qPCR, в качестве референсного гена был использован ген *hprt*. Точка «0» – уровень экспрессии в легких интактных животных. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Представлены данные (среднее \pm SD) одного из двух независимых экспериментов, 3-5 мышей в группе в каждой точке измерений.

клеток. Это ассоциировано с нарастанием продукции провоспалительных факторов и сопровождается формированием диссеминированного воспаления (оценка гистопатологии) и некротизирующих очагов, вскоре после чего животные умирают. Поскольку у устойчивых мышей В6 В-фолликулы сохраняются длительное время после заражения, мы предположили, что поддержание структуры В-фолликулов может быть ассоциировано со сдерживанием инфекционного процесса. Чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу мы решили проверить, повлияет ли удаление В-клеток в хронической стадии развития ТБ у таких животных на тяжесть течения инфекции.

Для этого мы ввели элиминирующие мАТ против CD20 (250 мкг/мышь) внутривенно мышам В6 через 16 недель после аэрозольного заражения вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (схема эксперимента представлена на Рисунке 31 А). Через 16 недель после заражения в легких мышей линии В6 обнаруживается достаточное количество В-лимфоцитов и В-фолликулов (Рисунок 13, 14), и при этом у животных еще не наблюдается кахексия. Введение элиминирующих АТ аCD20 привело к снижению В-клеток в крови до 2-3% через 2-ое суток после инъекции (Рисунок 31 Б, левые панели), а также к исчезновению рассеянных В-клеток в ткани легкого и практически полной деградации В-фолликулов в легких через 7 дней после инъекции (Рисунок 31 Б, правые панели). Несмотря на заявленную производителем эффективность удаления В-клеток на 30 дней после однократного введения АТ аCD20 (250 мкг/мышь), тем не менее мы наблюдали начинающееся возобновление пула В-лимфоцитов крови уже через 8-10 дней после инъекции. Чтобы добиться удаления В-лимфоцитов на более длительное время, мы вводили мАТ аCD20 трижды: через 16 недель после заражения, а затем через 10 и 20 дней после первой инъекции (Рисунке 31 А). Цитофлуориметрический анализ клеток легкого показал, что используемая схема позволяет сдерживать возобновление В-лимфоцитов, и через 4 недели (p2) с момента первичного введения элиминирующих антител (p0) их количество не превышало 3-4% от общего пула клеток (Рисунок 31 В).

Мы оценили влияние удаления В-лимфоцитов на основные показатели тяжести течения инфекции – количество микобактерий в легких и селезенке, кахексию и продолжительность жизни зараженных животных. Через 4 недели после первичного введения АТ аCD20 бактериальная нагрузка в легких и селезенке достоверно увеличилась по сравнению с контрольными животными (Рисунок 32 А,

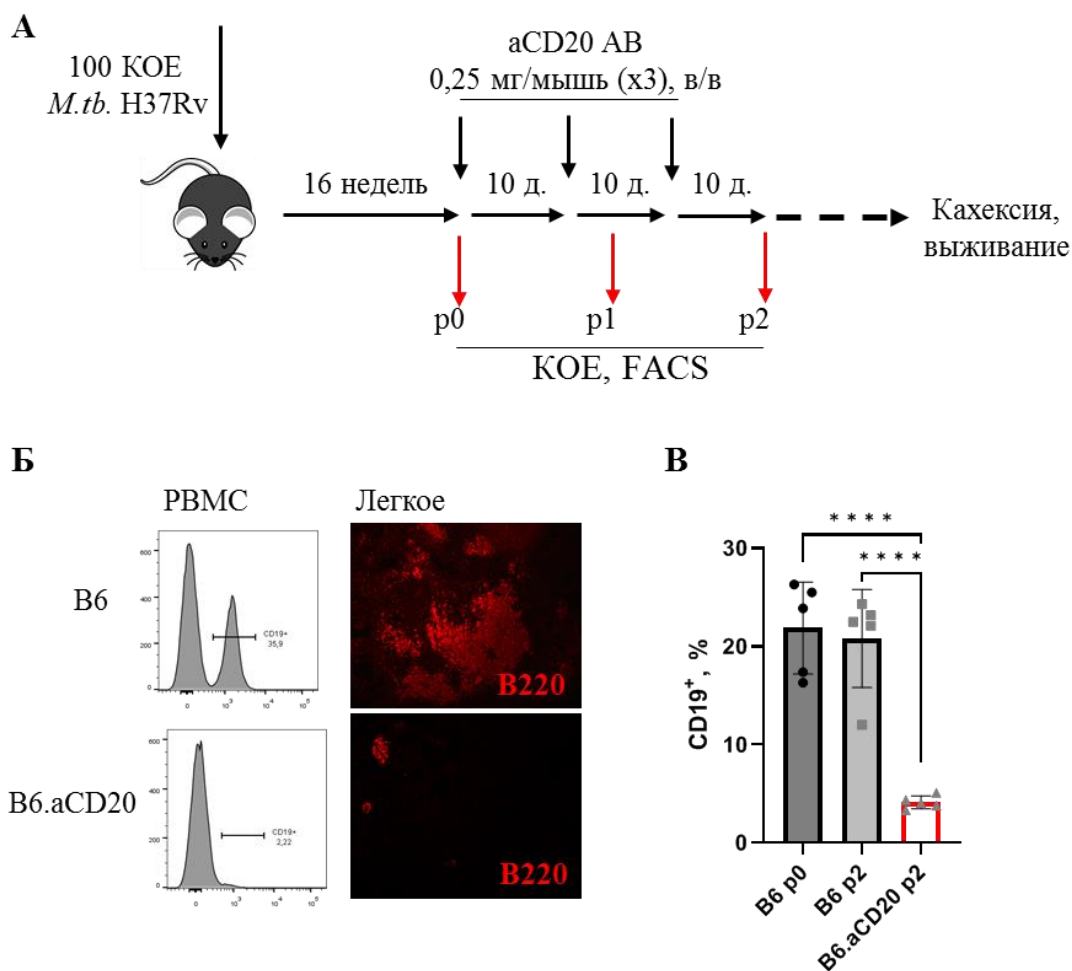


Рисунок 31. А – Схема эксперимента по оценке влияния удаления В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ у устойчивых мышей В6. **Б** – Контроль удаления В-клеток после введения элиминирующих мАТ аCD20 по анализу клеток CD19⁺ периферической крови с помощью проточной цитофлуориметрии (левые панели), а также ИГХ окраской легких мАТ против B220 (красный) через 7 дней после введения первой дозы АТ аCD20. **В** – Цитофлуориметрический анализ числа легочных В-лимфоцитов CD19⁺ через 16 недель после заражения до введения АТ аCD20 (p0) и через 1 месяц после введения 1-ой дозы АТ аCD20 (p2). Представлены средние значения ± SD, *****P* < 0,0001.

Б). Кроме того, удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ привело к более быстрой потере массы тела (Рисунок 32 В) и сокращению срока жизни (Рисунок 32 Г) таких животных по сравнению с контрольными мышами В6. В результате мы продемонстрировали, что удаление В-лимфоцитов в хронической стадии развития ТБ приводит к развитию чувствительного фенотипа.

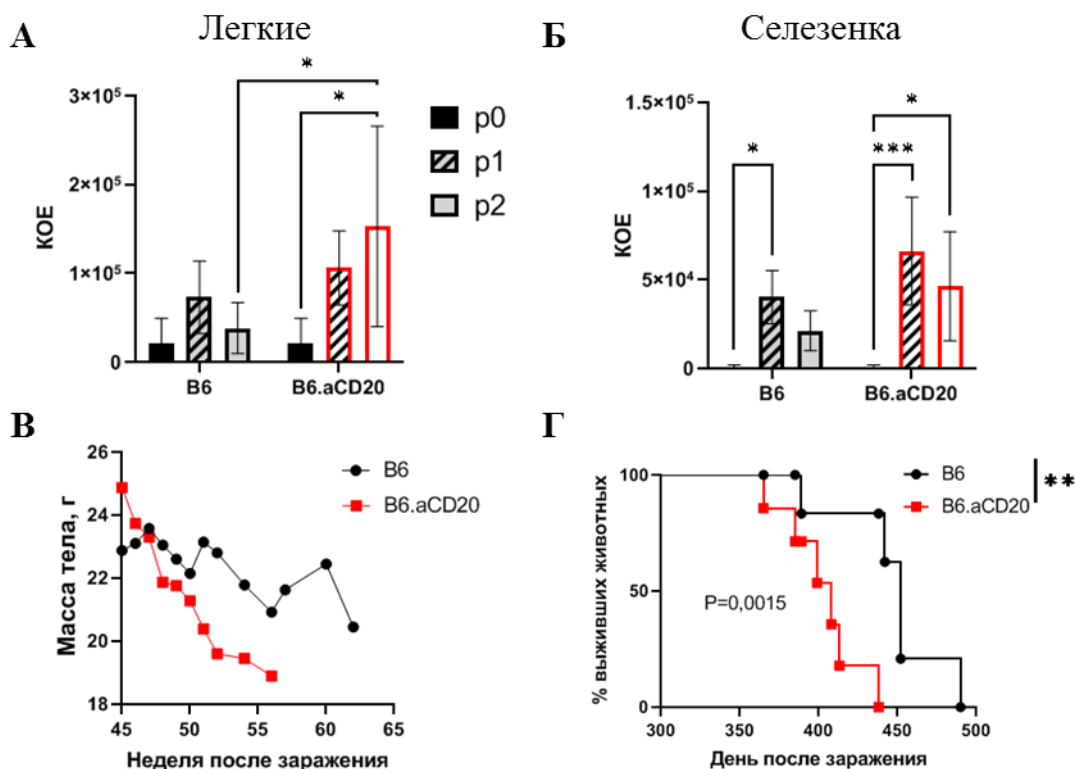


Рисунок 32. Удаление В-клеток у устойчивых мышей В6 в хронической стадии развития ТБ приводит к усугублению тяжести течения инфекции. **А, Б** – Анализ количества микобактерий в легких (А) и селезенке (Б) через 16 недель после заражения до удаления В-клеток (р0), и через 2 (р1) и 4 (р2) недели после 1-ой инъекции элиминирующих АТ aCD20. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. **В** – Контроль потери веса зараженных мышей В6 (контроль) и мышей с удаленными В-лимфоцитами (В6.aCD20). **Г** – Продолжительность жизни зараженных контрольных мышей В6 и В6.aCD20, n=8, Logrank-тест. Представлены данные одного из двух независимых экспериментов.

4.2.13.1. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии заражения устойчивых мышей В6 влияет на Т-клетки CD8⁺, но не CD4⁺

На следующем этапе исследований мы оценили, на какие параметры иммунного ответа повлияло удаление В-клеток. Как описано выше, в хронической стадии развития туберкулезной инфекции В-лимфоциты расположены в воспаленной ткани легкого и собраны в фолликулах, где тесно контактируют с Т-лимфоцитами CD4⁺, одними из главных игроков в борьбе с микобактериями. В связи с этим мы исследовали влияние элиминации В-клеток на количество и активацию Т-лимфоцитов, а также на специфическую продукцию ими провоспалительных цитокинов. К нашему удивлению, удаление В-лимфоцитов практически не повлияло на ветвь ответа Т-клеток CD4⁺ – ни частота, ни уровень активации этих клеток не изменились (Рисунок 33 А, Б). Количество Т-клеток CD4⁺, продуцирующих цитокины IFN- γ , TNF- α или IL-17 в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами, также сохранялся на одном уровне (Рисунок 33 В). Мы наблюдали небольшое повышение частоты Т-лимфоцитов CD8⁺, но уровень

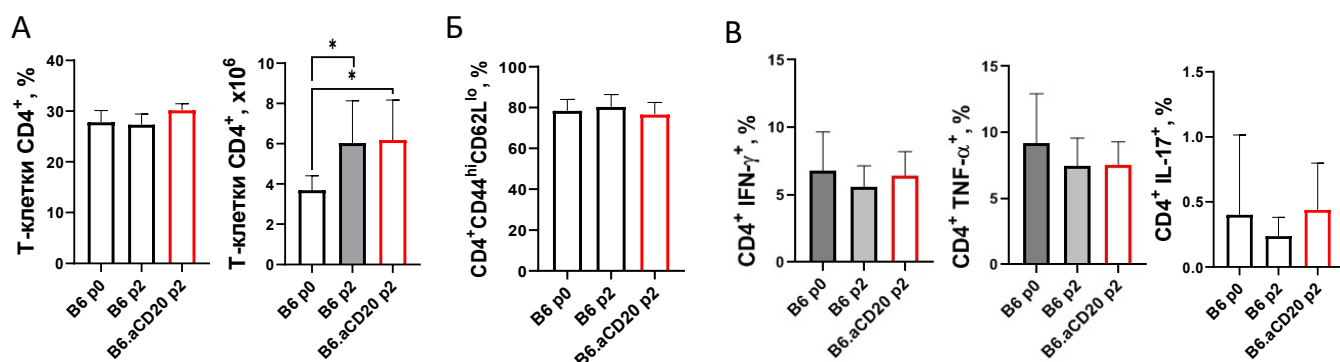


Рисунок 33. Анализ изменения относительного и абсолютного числа Т-клеток CD4⁺ (А) и уровня их активации (Б) в легких до (В6р0) и через 4 недели после введения элиминирующих АТ аCD20 (В6.аCD20.р2) в сопоставлении с контрольными животными В6.р2. В – Анализ числа легочных Т-клеток CD4⁺, специфически продуцирующих цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-17, после культивации суспензии клеток легкого в присутствии МАГ (10 мкг/мл). Оценка по внутриклеточному окрашиванию МАТ с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. * $P < 0,05$. Представлены данные (среднее \pm SD) одно из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе.

их активации был на одном уровне у контрольных мышей В6 и с удаленными В-лимфоцитами (Рисунок 34 А, Б). Однако, в отличие от Т-клеток CD4⁺, число Т-лимфоцитов CD8⁺, специфически секретирующих TNF- α или IL-17, возросло после удаления В-клеток (Рисунок 34 В).

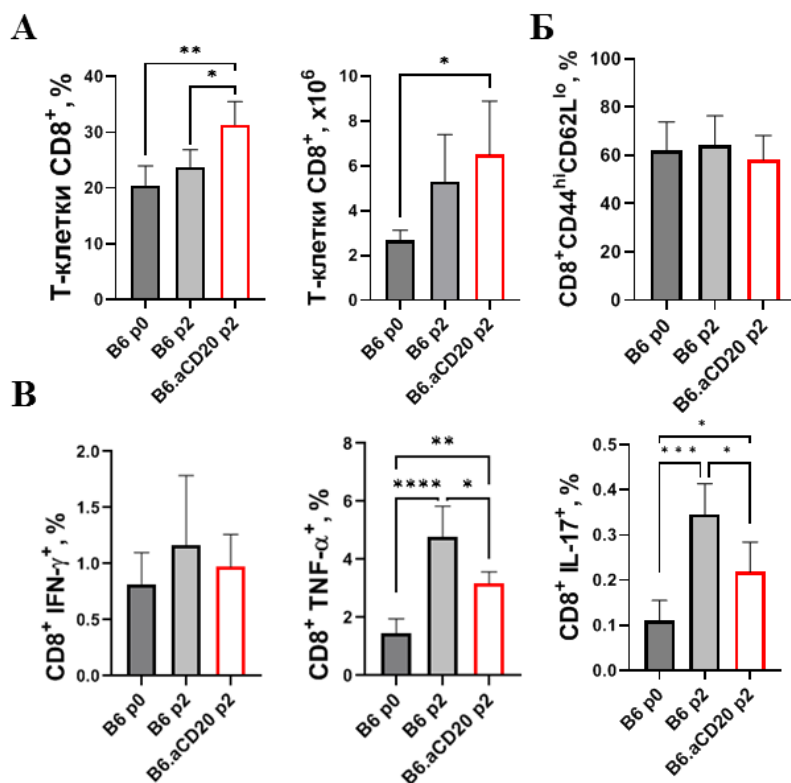


Рисунок 34. Анализ изменения относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов CD8⁺ в легких до (В6р0) и через 4 недели после введения элиминирующих АТ аCD20 (В6.аCD20.р2) в сопоставлении с контрольными животными В6.р2 (А), а также оценка и уровня их активации (Б). В – Анализ числа легочных Т-клеток CD8⁺, специфически продуцирующих цитокины IFN- γ , TNF- α и IL-17 после культивации суспензии клеток легкого в присутствии антигенов микобактерий (10 мкг/мл). Оценка по внутриклеточному окрашиванию мАТ с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Представлены данные (среднее \pm SD) одно из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе.

4.2.13.2. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии заражения устойчивых мышей В6 приводит к усилению нейтрофил-ассоциированного ответа

Как уже было отмечено, при ТБ на фоне дефицита В-лимфоцитов приток нейтрофилов в место инфицирования усиливается на ранних сроках после заражения [Maglione P., et al., 2007]. В используемой нами модели по удалению В-клеток в хронической стадии ТБ, мы наблюдали не значимое увеличения числа нейтрофилов (Рисунок 35 А). Однако на уровне мРНК в легком мы обнаружили

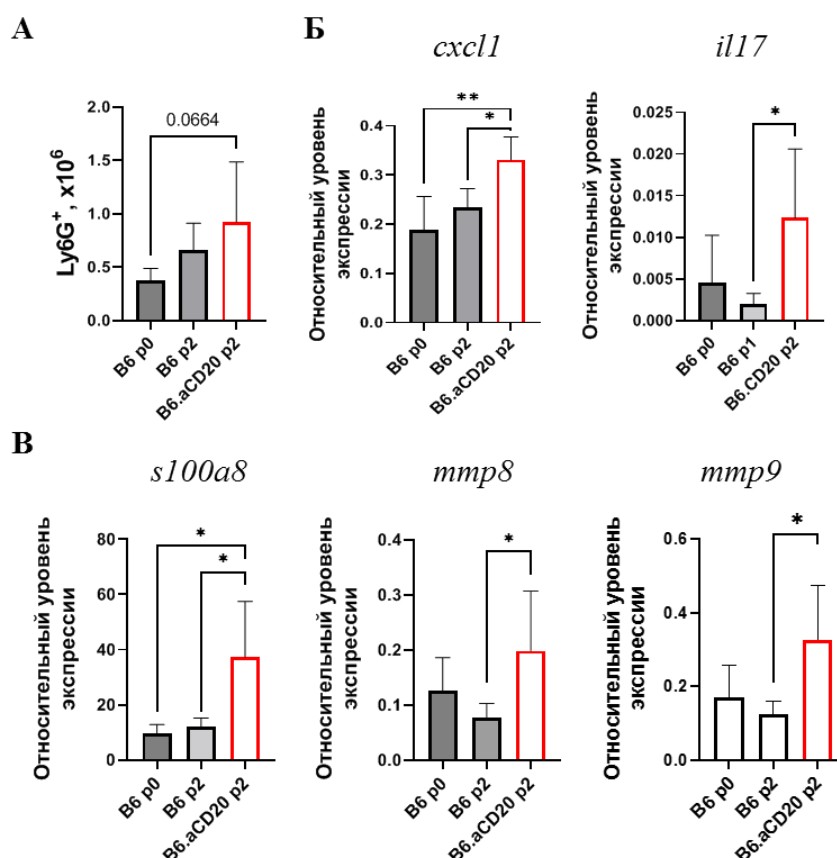


Рисунок 35. А – Анализ числа нейтрофилов Ly6G⁺ (методом проточной цитофлуориметрии) в легких мышей до (B6.p0) и через и через 4 недели после введения элиминирующих АТ aCD20 (B6.aCD20.p2) в сопоставлении с контрольными животными B6.p2. Б, В – Оценка уровня экспрессии генов хемоаттрактантов нейтрофилов (Б) и продуцируемых нейтрофилами факторов, ассоциированных с воспалением и патологией при ТБ (В) методом ПЦП в реальном времени, нормализация по уровню экспрессии *hprt*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Представлены данные (среднее \pm SD) одно из двух независимых экспериментов, 5 мышей в группе.

достоверное повышение экспрессии генов хемоаттрактантов нейтрофилов CXCL1 и IL-17 (Рисунок 35 Б), а также генов, кодирующих факторы, ассоциированные с нейтрофил-индуцированным воспалением и разрушением ткани – S100A8 и матриксных металлопротеиназ MMP8 и MMP9 (Рисунок 35 Б, В). Вероятно, в условиях дефицита В-лимфоцитов в легком создается благоприятное микроокружение для реализации ассоциированного с нейтрофилами воспаления.

Таким образом полученные нами данные является дополнительным основанием полагать, что длительное поддержание В-фолликулов в легких соотносится со сдерживанием инфекции и устойчивым фенотипом при ТБ.

4.3. Взаимодействие В-лимфоцитов и нейтрофилов

Ранее было показано, что мыши линии СВА и СВА/N-xid обладают одинаковой чувствительностью к первичному заражению ТБ, но мыши СВА/N-xid не отвечают на вакцинацию BCG против ТБ в отличие от линии СВА. Отсутствие вакцинного эффекта было ассоциировано со сниженной пролиферативной активностью Т-лимфоцитов в ответ на антигены микобактерий, но презентующие способности В-лимфоцитов мутантных животных и мышей дикого типа не отличалась [Nikonenko V.V., et al., 1996]. Генетически линия СВА/N-xid отличается от родительской линии СВА наличием миссенс-мутации в гене *Btk*, кодирующем тирозинкиназу Бруттона, (замена R28C в N-терминальном РН-домене белка), что приводит к X-сцепленному иммунодефициту [Rawlings D.J., et al., 1993, Thomas J.D., et al., 1993]. Это выражается в нарушении развития всего звена В-лимфоцитов: сильно сниженном количестве всех В-клеток, полному отсутствию лимфоцитов В1а, а также нарушению функций В-клеток [Hardy R.R., Hayakawa K., 1994, Khan W.N., et al., 1995]. Мутации в этом же гене у людей приводят к развитию тяжелого иммунодефицита – X-сцепленной агаммаглобулинемии (XLA, X-linked agammaglobulinemia) [Tsukada S., et al., 1993, Vetrie D., et al., 1993]. Поскольку оставалось неясным, как именно связаны нарушения функций В-клеток со снижением Т-клеточного ответа и отсутствием

эффекта вакцинации у мышей СВА/N, мы решили исследовать клеточные механизмы этого явления.

4.3.1. Перенос костного мозга или клеток эмбриональной печени восстанавливает способность мышей СВА/N к ответу на BCG

Мутация в гене *Vtk* в основном затрагивает развитие и функции В-лимфоцитов, но ген *Vtk* экспрессируется и в миелоидных клетках [Hata D., et al., 1998, Quek L.S., et al., 1998, Mukhopadhyay S., et al., 2002, Mangla M., et al., 2004]. В связи с этим, сначала мы проверили, восполнит ли адоптивный перенос клеток от ко-изогенной линии дикого типа дефект вакцинации у мутантных мышей СВА/N. Для этого были созданы радиационные костномозговые химеры мышей СВА и СВА/N. Затем одну из групп мышей «СВА→СВА/N» вакцинировали подкожно 2×10^7 BCG и затем всех заражали внутривенно *M. tuberculosis* H37Rv в количестве 5×10^5 КОЕ/мышь. Оказалось, что перенос костного мозга СВА реципиентам СВА/N восстанавливает их способность к вакцинации BCG, что выражается в снижении количества микобактерий в легких (Рисунок 36 А) и увеличении продолжительности жизни вакцинированных зараженных животных (Рисунок 36 Б). Перенос сингенного костного мозга от доноров СВА/N (контроль) не приводил к такому эффекту.

Поскольку основной эффект мутации в гене *Vtk* нарушает функции В-клеток и, в частности, лимфоцитов В1, мы проверили восстановит ли избирательный перенос предшественников В-клеток дефект вакцинации у мышей СВА/N. Для этого мы выделили клетки эмбриональной печени (ЭП, основного источника В-лимфоцитов в эмбриогенезе) мышей СВА на 17-18 день внутриутробного развития и ввели их мышам СВА/N в количестве 10×10^6 на мышь за 4 недели до вакцинации. Затем всех животных заразили *M. tuberculosis*. Оказалось, что восстановление популяции В-клеток (Рисунок 37 А) достаточно для эффективной вакцинации мышей СВА/N, что выразилось в снижении уровня размножения микобактерий в легких и селезенке (Рисунок 37 В, Г) и увеличении продолжительности жизни

вакцинированных зараженных животных СВА/Н с введенными клетками ЭП по сравнению с контрольными животными (Рисунок 37 Б).

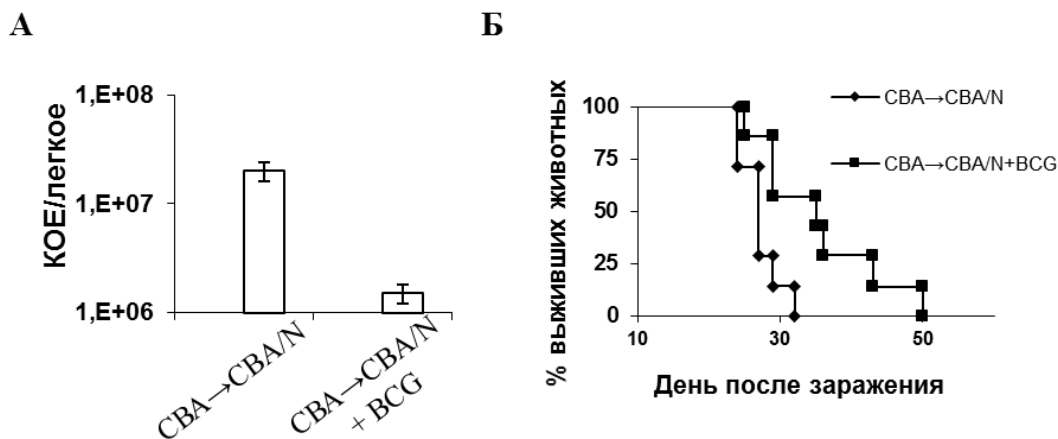


Рисунок 36. А – Оценка количества микобактерий в легких (А, представлены средние значения \pm SD) и время жизни (Б, критерий Гехана, $n=8$) вакцинированных зараженных мышей СВА/Н с перенесенным КМ мышей от мышей СВА по сравнению с контрольными животными (предварительно не вакцинированных BCG). Представлены данные одного из двух независимых экспериментов.

4.3.1. Клетки перитонеального экссудата мышей СВА/Н не активируют специфические Т-лимфоциты

Поскольку ранее было показано, что очищенные В-лимфоциты мышей СВА и СВА/Н обладают одинаковой способностью презентировать антигены микобактерий специфическим Т-лимфоцитам [Nikonenko V., et al., 1996], мы предположили, что нарушение формирования иммунного ответа может быть следствием нарушения процессинга и/или презентации антигенов профессиональными фагоцитами. Для проверки этой гипотезы мы оценили способность клеток перитонеального экссудата (КПЭ), нагруженных бактериями BCG *in vivo*, стимулировать к пролиферации специфические к микобактериальным антигенам линии Т-клеток. Для этого мы вводили бактерии BCG (10^8 /мышь) в перитонеальную полость мышей линий СВА и СВА/Н на 2 часа. Затем выделенные

клетки отмывали и помещали в совместную культуру со специфическими к антигенам микобактерий Т-линиями, полученными от мышей СВА и СВА/Н.

Как показано на Рисунке 38, антиген-презентирующие клетки (АПК) мышей СВА индуцировали пролиферативную активность Т-линий мышей СВА и СВА/Н с одинаковой эффективностью. Напротив, в присутствии АПК мышей СВА/Н не наблюдалось пролиферации ни одной из Т-линий.

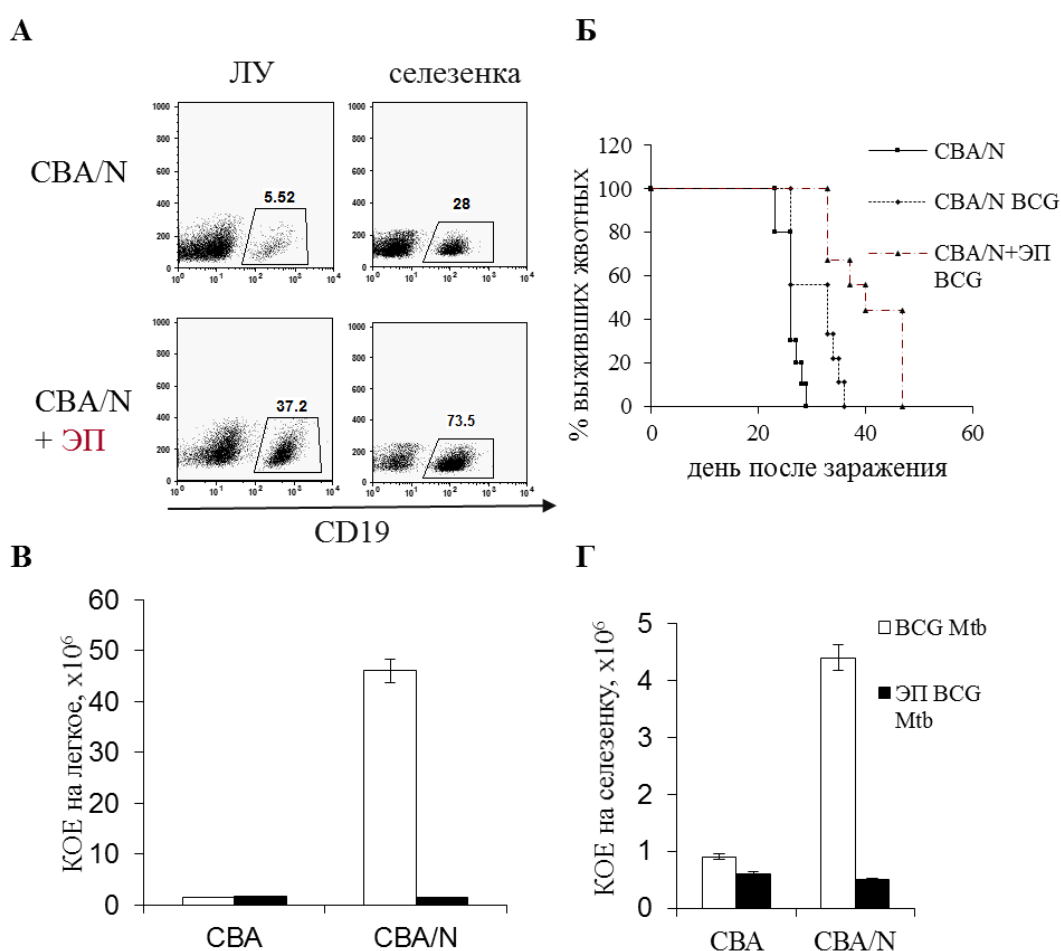


Рисунок 37. А – Оценка эффективности восстановления популяции В-клеток CD19⁺ в ЛУ и селезенке с помощью проточной цитофлуориметрии. Б, В, Г – продолжительность жизни (Б, критерий Гехана, n=8) и бактериальная нагрузка в легких (В) и селезенке (Г) зараженных и предварительно вакцинированных BCG мышей СВА/Н с восстановленными В-лимфоцитами (СВА/Н+ЭП BCG) по сравнению с контрольными животными (СВА/Н и СВА/Н BCG – зараженные без или с введением BCG, соответственно). В, Г – результаты представлены в виде средних значений \pm SD, 3-5 мышей в группе.

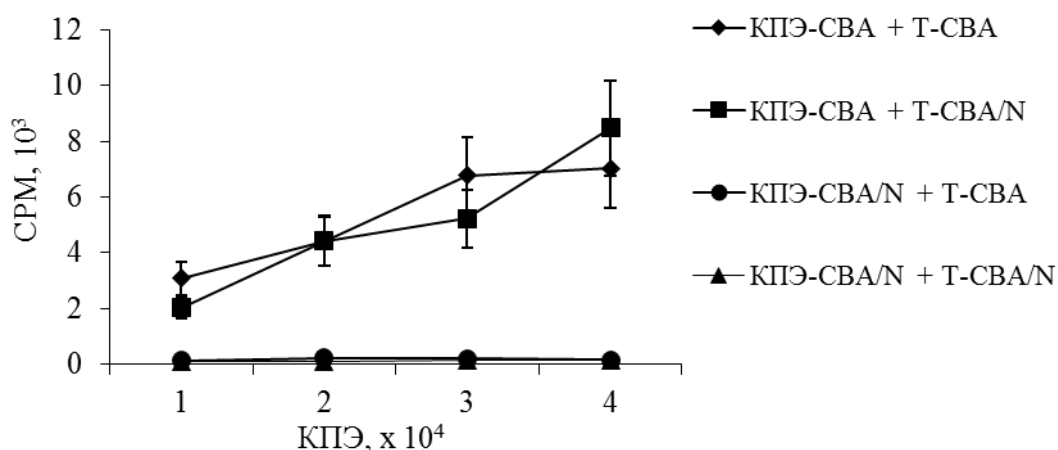


Рисунок 38. Оценка пролиферации специфических Т-линий СВА и СВА/Н в ответ на презентацию микобактериальных АГ КПЭ мышей СВА и CAN/N по включению радиоактивного [³H]-тимидина. Результаты представлены в виде средних значений CPM ± SD.

4.3.2. У мышей СВА/Н большую часть VCG поглощают нейтрофилы

Поскольку мы не обнаружили пролиферации Т-клеток в ответ на презентацию антигенов VCG АПК от мышей СВА/Н, мы решили еще раз оценить жизнеспособность выделяемых клеток и субпопуляционный состав. Известно, что одними из наиболее короткоживущих клеток в организме являются нейтрофилы. Кроме того, эти клетки крайне чувствительны к различным манипуляциям и не являются профессиональными АПК. В связи с этим, мы предположили, что большая часть выделяемых АПК мышей СВА/Н-хид могут быть нейтрофилами. Мы оценили соотношение популяций выделяемых клеток у мышей СВА и СВА/Н через разные промежутки времени после введения VCG. Оказалось, что через 1,5-2 часа после введения бактерий нейтрофилы составляют 70% от всех клеток перитонеального экссудата у мышей СВА/Н. При этом массовая миграция нейтрофилов у мышей СВА наступает позже. Нейтрофилы у мышей СВА составляют менее 20% через 2 часа после введения бактерий, т.е. в срок выделения АПК для опытов по презентации (Рисунок 39 А). Кроме того, общее количество

мигрирующих в перитонеальную полость нейтрофилов было на порядок выше у мышей СВА/N, чем у коизогенной линии СВА.

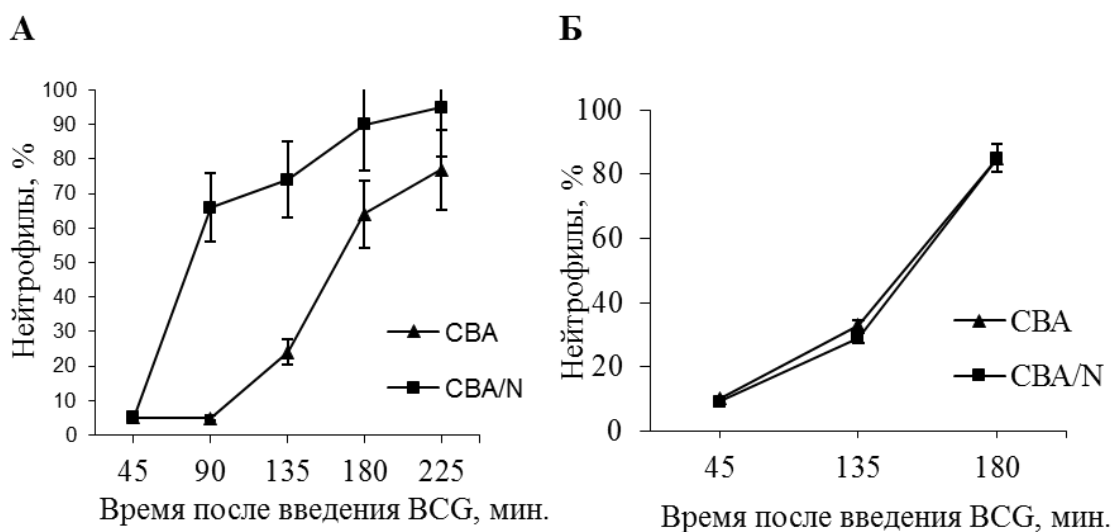


Рисунок 39. А – Оценка числа нейтрофилов в перитонеальной полости мышей СВА и СВА/N в различные сроки после введения BCG, 10^8 КОЕ/мышь. Б – Оценка числа нейтрофилов в перитонеальной полости мышей СВА и СВА/N в ответ на введение бактерий BCG после переноса КПЭ СВА, обогащённого В-клетками.

4.3.3. Перенос клеток СВА мышам СВА/N тормозит миграцию нейтрофилов

Чтобы понять, как влияют КПЭ на миграцию нейтрофилов, мы выделили эти клетки у наивных мышей СВА и ввели их мышам СВА/N за 15 часов до введения бактерий BCG. Поскольку в перитонеальной полости животных в норме большую часть клеток составляют В-лимфоциты, макрофаги и Т-клетки (~60% В-клетки CD19⁺, ~18% макрофаги F4/80⁺, ~17% Т-клетки CD3⁺), мы сделали два варианта переноса. В первом случае мы взяли всю популяцию клеток. Во втором случае мы взяли фракцию клеток, не прилипающих к пластику, обогатив их таким образом В-лимфоцитами (~75% CD19⁺, <4% F4/80⁺, ~21% CD3⁺). Затем реципиентам, а также контрольным мышам СВА/N, были введены бактерии BCG в количестве 10^8 КОЕ на мышь, после чего мы сравнили динамику миграции нейтрофилов. И в случае переноса не деленой популяции КПЭ (данные не приведены), и при переносе

обогащенной В-лимфоцитами непрелипающей фракции (Рисунок 39 Б) КПЭ мышей СВА приводило к торможению миграции нейтрофилов в перитонеальную полость мышей СВА/Н в ответ на бактерии VCG. Поскольку прилипание к пластику элиминировало 80-90% макрофагов, а функции Т-клеток мышей СВА/Н не изменены по сравнению с СВА, полученные данные позволяют предположить, что именно В-лимфоциты играют ключевую роль в снижении подвижности нейтрофилов в ответ на внешние стимулы.

4.3.4. Нейтрофилы мышей СВА/Н-хид обладают большей подвижностью

Для дальнейшего исследования влияния В-лимфоцитов на подвижность нейтрофилов, мы провели серию экспериментов в системе двухкамерных планшетов Transwell *in vitro*. Для этого выделяли перитонеальные нейтрофилы мышей СВА и СВА/Н, через 3,5 часа после инъекции пептона (>90% полиморфно-ядерных клеток Ly-6G⁺). Затем нейтрофилы помещали в верхнюю камеру планшета. В нижнюю камеру вносили или чистую культуральную среду (контроль), или разные комбинации клеток (целиком популяцию клеток или обогащенные В-лимфоциты) с добавлением VCG или без него. Количество мигрирующих в нижнюю камеру нейтрофилов оценивали через 1 час после инкубации с помощью проточной цитометрии.

Как показано на Рисунке 40, нейтрофилы СВА/Н мигрируют быстрее, чем СВА при добавлении В-клеток в нижнюю камеру. Кроме того, видно, что спонтанная подвижность нейтрофилов СВА/Н, без стимула от В-лимфоцитов, также выше (Рисунок 34). Интересно, что добавление бактерий VCG, независимо от присутствия В-лимфоцитов, не влияло на скорость миграции нейтрофилов (Рисунок 34Б). Таким образом, мы подтвердили разницу в скорости миграции нейтрофилов СВА и СВА/Н *in vivo*, но нам не удалось смоделировать ингибирование миграции нейтрофилов В-лимфоцитами. Вероятно, система *in vitro*, не полностью повторяет условия, формирующиеся в перитонеальной полости.

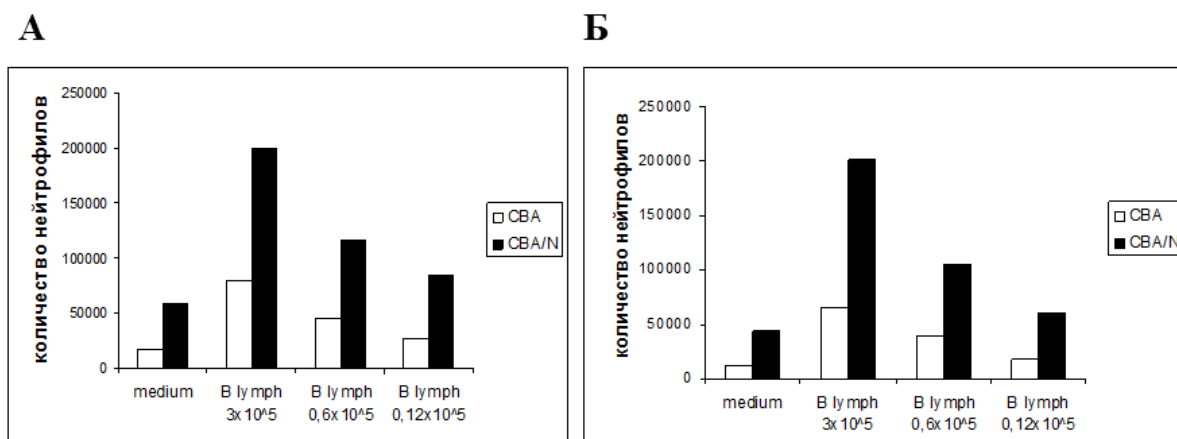


Рисунок 40. Миграция нейтрофилов СВА и СВА/Н в системе transwell. Нейтрофилы выделяли из перитонеальной полости мышей обеих линий (миграцию стимулировали введением пептона на 4ч). В верхнюю камеру планшета transwell помещали нейтрофилы в количестве 5×10^5 на лунку. В качестве аттрактантов движения в нижнюю камеру помещали В-лимфоциты перитонеальной полости мышей СВА в количестве 3, 0,6 и $0,12 \times 10^5$ клеток/лунку в чистой среде (А) или с добавлением BCG (В). Через 1 ч клетки извлекали из лунок и проводили подсчет нейтрофилов в нижней камере после окраски мечеными антителами анти-ЛубG и анализа клеток с помощью проточного цитофлуориметра. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов.

4.3.5. Разница в миграции нейтрофилов совпадает с динамикой экспрессии генов хемокинов в КПЭ, но не с уровнем соответствующих белков в перитонеальном экссудате

Далее мы попытались определить, какие же факторы способствуют более быстрой миграции нейтрофилов у мышей СВА/Н-хид. Во многих работах показано, что совместное действие хемокинов семейства CXC – CXCL1 (KC) и CXCL2 (MIP2), также как G-CSF [Lee J., et al., 1995, Wengner A.M., et al., 2008] и цитокинов IL-6 и IL-17 [Griffin G.K., et al., 2012, Liu R., et al., 2016] приводит к мобилизации и привлечению нейтрофилов в область воспаления. В связи с этим мы оценили количество этих факторов в перитонеальном экссудате мышей обеих линий после введения бактерий BCG. В качестве контроля были использованы животные,

которым вводили PBS. Уровень белков CXCL1, CXCL2 и G-CSF после введения PBS был ниже уровня чувствительности используемых наборов ELISA. Однако после введения BCG уже через 30 минут наблюдалось стремительное увеличение исследуемых факторов у мышей обеих линий (CXCL1: 1413 ± 304 and 847 ± 352 пг/мл, соответственно, $P > 0.05$; CXCL2: 865 ± 204 и 705 ± 169 пг/мл, соответственно, $P > 0.05$). Через 1,5 часа уровень CXCL1 также продолжал увеличиваться и не отличался между линиями животных. Таким образом, мы предполагаем, что такое быстрое накопление хемокинов в перитонеальной жидкости происходит не вследствие синтеза *de novo*, но вследствие секреции уже накопленных факторов эпителиальными и эндотелиальными клетками перитонеальной полости хозяина. Вместе с тем отсутствие межлинейных различий видимо является следствием того, что ген *Btk* не экспрессируется в этих клетках или не участвует в сигнальных путях, участвующих в запуске продукции исследуемых факторов, а значит они не отличаются у мутантных и животных дикого типа. Кроме того, отсутствие разницы в хемоаттрактантах нейтрофилов указывает на то, что в случае мышей CBA на нейтрофилы вероятнее действует какой-то ингибирующий фактор, а не сниженная продукция хемокинов В-клетками.

Вместе с тем, при оценке уровня G-CSF, мы обнаружили значительно большее количество этого белка в перитонеальной жидкости мышей CBA/N, чем CBA (485 ± 28 пг/мл и 279 ± 29 пг/мл, соответственно, $P = 0.023$). Через 1,5 часа после введения BCG разница в продукции G-CSF соответствовала разнице в количестве мигрировавших нейтрофилов у мутантных CBA/N-xid и мышей дикого типа.

Показано, что регуляция миграции нейтрофилов осуществляется как паракринно за счет продукции хемокинов различными стромальными клетками, так и аутокринно [Furze R.C., Rankin S.M., 2008]. В связи с этим мы оценили экспрессию генов хемокинов и цитокинов, хемоаттрактантов нейтрофилов, клетками перитонеальной полости мышей обеих линий до и после введения BCG в динамике. Мы показали, что до введения BCG уровень экспрессии генов *Gcsf* и

Cxcl1 в КПЭ мышей СВА был выше, чем у СВА/Н (Рисунок 41). При этом между ними не было разницы по экспрессии генов *Cxcl2* (Рисунок 41), *Il6* и *Il17* (данные не приведены). После введения ВСГ в клетках перитонеальной полости наблюдалось быстрое изменение экспрессии генов хемокинов и цитокинов, участвующих в привлечении нейтрофилов, что соответствовало динамике притока нейтрофилов у мышей СВА и СВА/Н (Рисунок 39 А). Экспрессия генов *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Gcsf*, а также гена рецептора к СХС хемокинам *Cxcr1*, одновременно стремительно возрастала через 45 минут после введения ВСГ у мышей СВА/Н. При этом у мышей СВА увеличение экспрессии наблюдалось только для гена *Cxcl2*. Уровень экспрессии *Cxcl1* у них не изменялся, а генов *Gcsf* и *Cxcr1* резко падал в ответ на введение ВСГ, по сравнению с уровнем экспрессии в клетках перитонеальной полости интактных животных. Через 3 ч уровень экспрессии всех исследуемых генов выравнивался (Рисунок 41), что полностью соотносится с динамикой миграции нейтрофилов (Рисунок 39 А).

Таким образом, вероятно участвуют два фактора, влияющие на разницу в притоке нейтрофилов у мышей СВА и СВА/Н. Во-первых, судя по отсутствию разницы в концентрациях хемоаттрактантов нейтрофилов (кроме G-CSF) в перитонеальном экссудате, в случае мышей СВА на нейтрофилы действует и какой-то ингибирующий фактор. Вместе с тем увеличение экспрессии одного из генов хемокинов у мышей СВА оказывается не достаточным для активации быстрой миграции нейтрофилов. Напротив, одновременное повышение экспрессии генов трех хемокинов и рецептора к ним, как у мышей СВА/Н, приводит к быстрой мобилизации и притоку нейтрофилов в место введения инфекции. Эти факторы взаимосвязаны и, видимо, прямо или опосредованно регулируются В-лимфоцитами [Wengner A.M., et al., 2008].

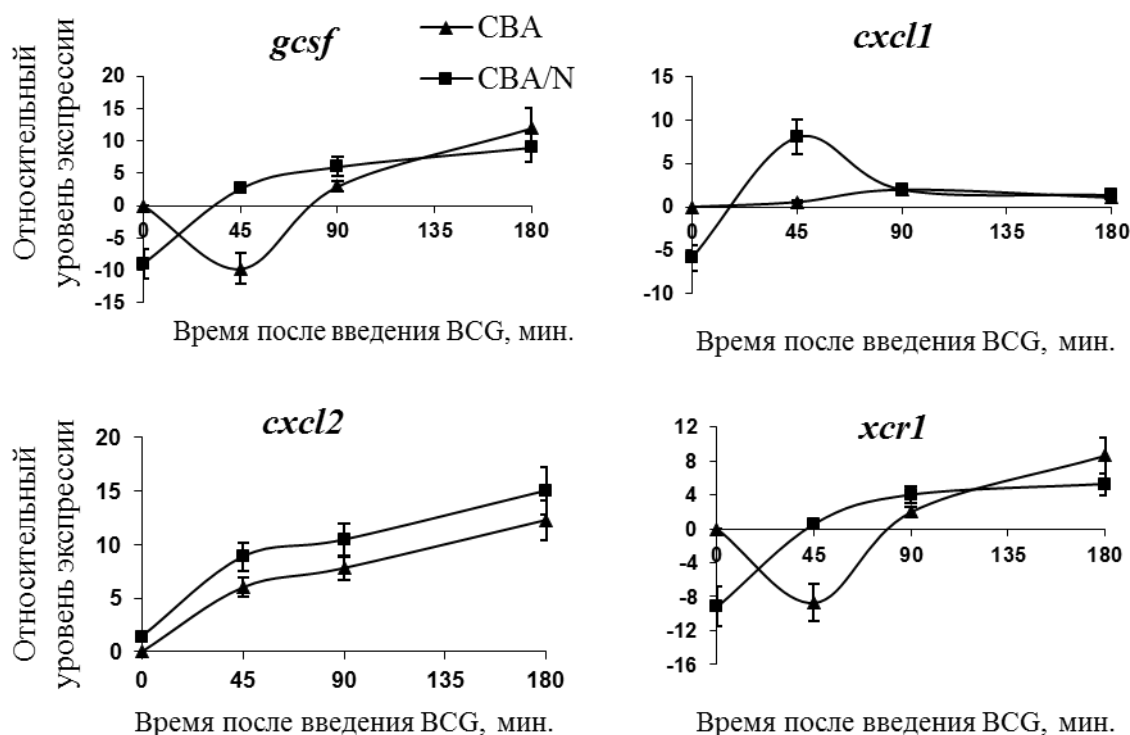


Рисунок 41. Экспрессия генов факторов, участвующих в привлечении нейтрофилов, клетками перитонеального экссудата (КПЭ) мышей линий CBA и CBA/N. Представлены суммированные результаты трех независимых экспериментов. РНК была выделена от пулированных КПЭ от трех мышей в группе ($n = 9$). В перитонеальную полость мышей CBA и CBA/N вводили бактерии BCG (10^8 КОЕ/мышь). Затем через 45, 90 и 180 минут выделяли клетки перитонеальной полости с последующим выделением РНК. Уровень экспрессии оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени, нормализация по уровню экспрессии гена *actin*.

4.3.6. Удаление нейтрофилов *in vivo* восстанавливает эффективность вакцинации BCG у мышей CBA/N-xid

В связи с обнаруженной разницей в динамике притока нейтрофилов в ответ на введение BCG, мы оценили, какие именно клетки перитонеальной полости преимущественно фагоцитируют бактерии BCG через 2 часа после инъекции. Действительно, большая часть бактерий была ассоциирована с моноцитами у мышей дикого типа CBA (Рисунок 42 А), но с нейтрофилами у мышей CBA/N-xid

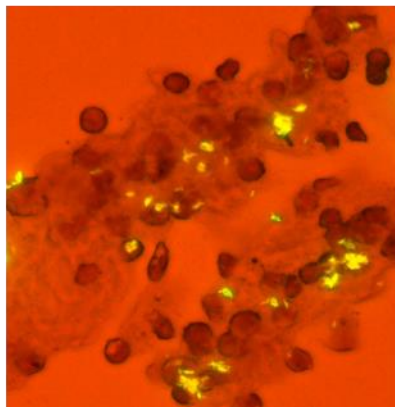
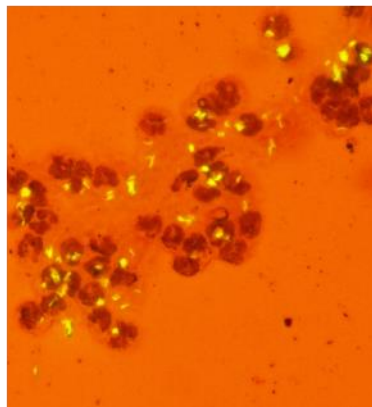
А**Б**

Рисунок 42. Оценка колокализации микобактерий BCG и клеток перитонеального экссудата мышей CBA (А) и CBA/N (Б). В перитонеальную полость мышей CBA и CBA/N вводили бактерии BCG (10^8 КОЕ/мышь), затем через 2 ч получали КПЭ. Окрашивание микобактерий проводили аураминол (желтый) с последующей окраской КПЭ гематоксилином.

(Рисунок 42 Б). Таким образом, бактерии экранированы от профессиональных АПК, макрофагов, у мутантных животных.

Мы предположили, что похожий эффект может наступать и при вакцинации исследуемых животных. Для проверки этой гипотезы мы решили удалить нейтрофилы у мышей CBA/N непосредственно перед вакцинацией (схема эксперимента представлена на Рисунке 43 слева). Для это мы вводили антитела анти-Ly-6G/Ly-6C (RB6-8C5) в перитонеальную полость мышей CBA/N. В качестве контроля использовали АТ того же изотипа. Через 15 часов после введения АТ содержание нейтрофилов в крови упало на 99% (Рисунок 43 А). В этот момент мышей вакцинировали BCG подкожно в дозе 10^7 КОЕ/мышь. Затем через 5 недель животных заражали внутривенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Эффективность вакцинации оценивали по количеству бактерий в легких и селезенке, а также по числу IFN- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов CD4⁺ в легких через 3 недели после заражения.

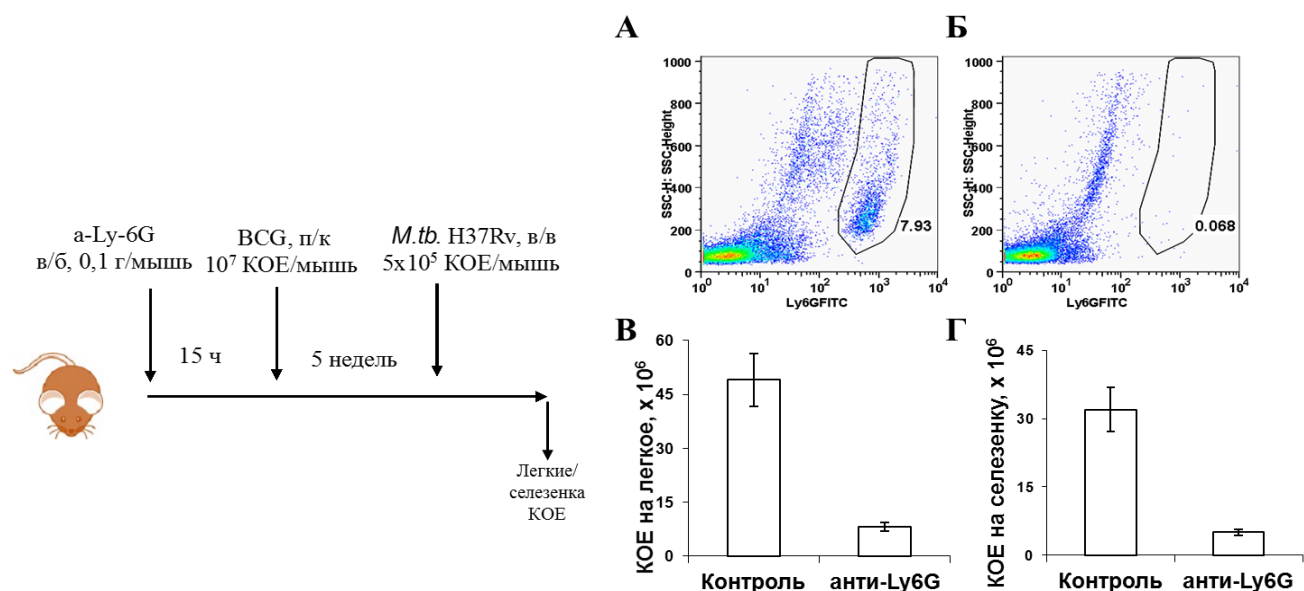


Рисунок 43. Влияние удаления нейтрофилов у мышей СВА/Н в момент введения BCG на эффективность их вакцинации. **А, Б** – Оценка эффективности удаления нейтрофилов в крови мышей СВА/Н после введения антител к Ly6G методом проточной цитометрии (левая панель – изотипический контроль, правая панель – введение АТ RB6-8С5). **В, Г** – Оценка числа микобактерий в легких (В) и селезенке (Г) вакцинированных и затем зараженных мышей СВА/Н (5 мышей в группе) после введения АТ (анти-Ly6G) или изотипического контроля (контроль) через 3 недели после заражения. Результаты представлены в виде средних значений \pm SD.

Мы показали, что однократного введения АТ, элиминирующих нейтрофилы, достаточно для восстановления эффекта вакцинации у мышей СВА/Н-хид. Как показано на Рисунке 43 (В, Г), у вакцинированных мышей СВА/Н на порядок снижалось количество бактерий в легких и селезенке по сравнению с контрольными животными. Кроме того, количество IFN- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов CD4⁺ в легких оказалось почти в 3 раза выше у мышей СВА/Н с удаленными нейтрофилами, по сравнению с контрольными животными (14888 ± 952 и 5460 ± 315 ; $P < 0,01$). Эти данные являются прямым свидетельством того, что у мышей с дефицитом В-лимфоцитов, измененная миграция нейтрофилов является причиной нарушения эффекта вакцинации BCG для последующего заражения ТБ.

5. Обсуждение

Макрофаги и Т-лимфоциты CD4⁺ традиционно считаются основными клетками в защитном иммунном ответе на микобактериальные инфекции. Макрофаги поглощают микобактерии и презентуют микобактериальные антигены Т-лимфоцитам CD4⁺. В ответ Т-клетки производят IFN- γ , который в свою очередь активирует макрофаги на продукцию противомикробных компонентов, в том числе активных форм азота NO, а также IL-12, активирующего Т-лимфоциты [Flesch I.E.A. and Kaufman S.H.E., 1990, Cooper A., et al., 1993, Cooper A., et al., 1997]. Таким образом осуществляется взаимная активация обоих типов клеток. Помимо макрофагов и Т-лимфоцитов существуют и другие клетки иммунной системы, принимающие участие в ответе при туберкулезе и микобактериозах. В частности, это В-лимфоциты и нейтрофилы, традиционно не считавшиеся основными участниками иммунного ответа на микобактерии. Тем не менее, и нейтрофилы, и В-лимфоциты, мигрируют в легкое в ответ на проникновение микобактерий *M. tuberculosis* и *M. avium*. Данная работа посвящена исследованию этих «неканонических» участников иммунного ответа на микобактерии, роль которых может быть очень важной, но остается недостаточно изученной.

Нейтрофилы первыми из клеток иммунной системы проникают в область попадания инфекции для элиминации патогена. Это традиционный механизм врожденного иммунитета, направленный на борьбу с инородными компонентами, но в зависимости от генетики хозяина и природы патогена борьба нейтрофилов с инфекционными агентами может иметь разные последствия. Для многих инфекций показано, что нейтрофилы действительно успешно выполняют эффективную защитную функцию [Amulic B., et al., 2012, Потапнев М.П. и др., 2019]. Однако длительная коэволюция микобактерий *M. tuberculosis* и млекопитающих с одной стороны, и приспособленность *M. avium* к жизни во внешней среде в сочетании с широким спектром потенциальных хозяев с другой стороны, привели к тому, что противомикробные средства нейтрофилов стали малоэффективны против микобактерий.

В литературе до сих пор роль нейтрофилов при микобактериальных инфекциях является предметом дискуссии. В зависимости от активности притока нейтрофилов, времени их персистенции в начальной или хронической стадии инфекции, а также степени дифференцировки, их роль в воспалительном процессе может меняться. Существуют данные о роли нейтрофилов в индукции образования гранул [Sugawara I., et al., 2004, Blomgran R., Ernst J.D., 2011], а также бактерицидных свойствах нейтрофилов в отношении микобактерий [Martineau A.R., et al., 2007]. Однако большая часть исследований свидетельствует скорее о патогенной роли нейтрофилов. В экспериментах на мышах [Eruslanov E., et al., 2005] и с использованием нейтрофилов периферической крови человека [Kisich K.O., et al., 2002] показано, что нейтрофилы плохо убивают микобактерии, даже при их дополнительной стимуляции цитокинами IFN- γ и/или TNF- α . Во многих лабораториях, в том числе нашей, было показано, что у генетически чувствительных к ТБ мышей тяжесть течения инфекции связана с мощным притоком нейтрофилов в легкие и образованием некротических очагов [Eruslanov E., et al., 2005, Keller C., et al., 2006, Kondratieva E, et al., 2010, Marzo E., et al., 2014, Yeremeev V., et al., 2015, Driver E., et al., 2012].

Исходя из данных, полученных нами и в других лабораториях, ответ нейтрофилов зависит не только от генетики хозяина, но и от вирулентности патогена. В наших исследованиях при заражении слабо вирулентными микобактериями *M. avium* мышей конгенных линий В100 и В139, отличающихся β -цепью МНС-II, большой приток нейтрофилов был отмечен у более устойчивой линии В100 (Рисунок 11). При этом нейтрофилы мышей этих линий не убивали микобактерии *M. avium in vitro* и не отличались по уровню апоптоза (Рисунок 12). Более того, по мере прогрессирования инфекции приток нейтрофилов нарастал и не различался между линиями. В связи с этим мы полагаем, что в случае инфицирования маловирулентными бактериями разница в степени инфильтрации нейтрофилами, а также уровень экспрессии генов хемоаттрактантов нейтрофилов *Cxcl1*, *Cxcl2* и *Il17* отражает уровень общего воспаления в легких, но не вносит дополнительный вклад в развитие чувствительного фенотипа, обусловленного в

данном случае экспрессией аллеля *s* гена *Slc11a1* и соответствующего белка в фагосомах макрофагов, а также β -цепью молекул МНС-II. В соответствии с полученными нами данными ранее было показано, что удаление нейтрофилов у чувствительных животных при заражении *M. avium*, или инфицирование ими мышей CD18KO с нарушенным диапедезом нейтрофилов, не влияет на продолжительность жизни и не приводит к снижению бактериальной нагрузки в органах [Petrofsky M., Bermudez L.E., 1999].

Инфекция высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis* H37Rv приводит к развитию другого сценария. Как отмечено выше, нейтрофилы быстро мигрируют в область проникновения инфекции и эффективно фагоцитируют микобактерии. Уже через 1-2 недели после заражения ТБ в легких мышей чувствительной линии I/St накапливается значительно больше нейтрофилов, по сравнению с устойчивой к ТБ линией A/Sn, что приводит к формированию некротических очагов и тяжелой патологии [Eruslanov E., et al., 2005]. В связи с этим мы решили проверить, повлияет ли удаление нейтрофилов в первые дни после инфицирования вирулентными микобактериями *M. tuberculosis* H37Rv на тяжесть течения ТБ у чувствительной линии мышей I/St. Действительно, удаление нейтрофилов до и в первые дни после заражения привело к уменьшению патологии легких, снижению бактериальной нагрузки в легких и селезёнке и увеличению продолжительности жизни чувствительных мышей I/St, но не устойчивых мышей B6 (Рисунок 1, 2). Это соотносится с полученными недавно данными с использованием других генетически чувствительных к ТБ мышей – C3HeB/FeJ и *Nos2^{-/-}* [Lovewell R.R., et al., 2020]. Удаление нейтрофилов в первые дни после аэрозольного заражения снижало число КОЕ в легких у чувствительных, но не у контрольных мышей устойчивой линии B6 [Lovewell R.R., et al., 2020]. Кроме того, мы показали, что удаление нейтрофилов у чувствительных к ТБ мышей сопровождается повышением продукции IFN- γ Т-лимфоцитами (Рисунок 3), что свидетельствует о негативном влиянии нейтрофилов на продукцию этого защитного цитокина. Механизм такого влияния требует дальнейшего изучения, однако возникший эффект может быть следствием параллельного удаления

гранулоцитов Ly6G^{hi}, которые могут, в частности, продуцировать супрессорный цитокин IL-10 [Gideon H.P., et al., 2019], и гранулоцитов Ly6G^{mid}, имеющих функции миелоидных супрессоров [Knaul J. K., et al., 2014, Tsiganov E. N., et al., 2014, Magcwebeba T., et al., 2019]. Вероятно, что стоит принимать во внимание и генетическую основу нейтрофилов, поскольку показано, что клетки Ly6G^{hi} и Ly6G^{mid}, полученные от чувствительных к ТБ мышей 129SvPas, но не линий B6, C3HeB/FeJ и Nos2^{-/-}, подавляют продукцию IFN- γ Т-лимфоцитами [Lovewell R.R., et al., 2020].

Другим возможным объяснением ингибирующего действия нейтрофилов могут служить полученные нами недавние данные. Мы провели исследование по сопоставлению экспрессии генов микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv, фагоцитированных нейтрофилами или макрофагами, с контрольными микобактериями, выращенными в стандартных условиях в среде Дюбо [Majorov K., et al, 2003]. Оказалось, что после поглощения нейтрофилами в микобактериях на более высоком уровне экспрессируются гены регуляторной системы DosR [Kondratieva E., et al., 2022], связанной с переходом микобактерий в дормантное, покоящееся, состояние [Leistikow R.L., et al., 2010; Вишневский Б.И., и др., 2014]. Интересно, что анализ популяций клеток легкого мышей, зараженных микобактериями, «прошедшими» через нейтрофилы, показал меньшую иммуногенность таких бактерий. Это выражалось в меньшей инфильтрации легких Т-клетками CD4⁺ и макрофагами F4/80⁺ по сравнению с контрольными животными, инфицированными микобактериями, выращенными в среде Дюбо в стандартных условиях. Таким образом, повышенная инфильтрация нейтрофилами и активный фагоцитоз ими микобактерий в первые дни после заражения может приводить к снижению активации Т-клеток.

Примечательно, что в нашем эксперименте удаление нейтрофилов на ранней стадии имело продолжительный эффект и оказывало положительное влияние даже после полного восстановления популяции нейтрофилов. Это говорит о том, что первые стадии развития заболевания очень важны для правильного формирования иммунного ответа при ТБ, в том числе, в хронической стадии. На поздних стадиях

развития ТБ нейтрофилы, помимо прочего, ассоциированы с деструкцией ткани легкого, т.к. они содержат металлопротеиназы [Ong C. W., et al., 2015], разрушающие ткань и способствующие образованию каверн. При этом нейтрофилы не содержат молекулы TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), способствуя таким образом неограниченному действию металлопротеиназ [Masure S., et al., 1991].

Эффект патогенного действия нейтрофилов может быть объяснён несколькими факторами. Нейтрофилы, мигрирующие в первые моменты после заражения, эффективно фагоцитируют бактерии, но, в отличие от макрофагов, не убивают их [Eruslanov E., et al., 2005, Berry M., et al., 2010, Corleis B. F., et al., 2012]. Вместе с тем, нейтрофилы, содержащие микобактерии, могут быть фагоцитированы макрофагами. Недавно было показано, что последующая активность макрофагов зависит от статуса нейтрофилов. Фагоцитоз микобактерий нейтрофилами приводит к их гибели путем апоптоза или некроза [Aleman M., et al., 2002, Aleman M., et al., 2004, Dallenga T., et al., 2018]. Если нейтрофил погибает путем апоптоза, то поглотивший его макрофаг эффективно убивает микобактерии. В случае, если нейтрофилы с микобактериями гибнут некрозом, который активируется АФК, то поглотивший их макрофаг уже не справляется с патогеном [Dallenga T., et al., 2017]. Таким образом могут регулироваться последующие пути формирования иммунных реакций. Поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что на нейтрофилах мышей I/St снижена экспрессия активирующего апоптоз рецептора CD95 (Fas) по сравнению с нейтрофилами мышей устойчивой линии A/Sn [Eruslanov E., et al., 2005], вероятно, что удаление таких клеток способствует формированию более эффективного иммунного ответа. Кроме того, недавно показано, что нейтрофилы являются предпочтительной нишей для размножения микобактерий у чувствительных к ТБ мышей на поздних сроках развития инфекционного процесса, тогда как эффективный Т-клеточный ответ направлен на элиминацию бактерий внутри макрофагов, но не нейтрофилов [Lovewell R.R., et al., 2020]. Это также соотносится с недавними данными о том, что удаление нейтрофилов даже у устойчивых к ТБ мышей В6 в хронической фазе

развития инфекционного процесса (95-105 дней после инфицирования) снижает бактериальную нагрузку в легких и селезенке [Scott N.R, et al., 2020].

Мы обнаружили и другой пример патогенного действия нейтрофилов. Как описано выше, мыши линий СВА и СВА/N-xid обладают одинаковой чувствительностью к первичному заражению ТБ, но мыши СВА/N-xid с нарушенными функциями В-лимфоцитов не отвечают на вакцинацию BCG против ТБ в отличие от линии СВА. Генетически линия СВА/N-xid отличается от родительской линии СВА наличием миссенс-мутации в гене *btk*, который экспрессируется преимущественно в В-лимфоцитах, но также и в миелоидных клетках [Hata D., et al., 1998, Quek L.S., et al., 1998, Mukhopadhyay S., et al., 2002, Mangla M., et al., 2004]. Поскольку оставалось неясным, как именно связаны нарушения функций В-лимфоцитов и/или миелоидных клеток с отсутствием эффекта вакцинации у мышей СВА/N, мы исследовали клеточные механизмы этого явления.

Мы показали, что формированию защитного эффекта вакцины BCG у мышей линии СВА/N-xid препятствует быстрый приток нейтрофилов в место введения микобактерий (Рисунок 39). Мы обнаружили, что разница в миграции нейтрофилов в исследуемой нами модели обусловлена несколькими факторами. Во-первых, собственная подвижность нейтрофилов мышей СВА/N-xid выше по сравнению с родительской линией СВА (Рисунок 40), что хорошо соотносится с повышением миграции нейтрофилов в присутствии ингибитора ВТК LFM-A13 [Zen K., Liu Y., 2008] и, возможно, с необходимостью киназы ВТК для полимеризации актина и активации движения клеток [Sharma S., et al., 2009].

Во-вторых, более быстрая миграция нейтрофилов в область введения бактерий BCG у мышей СВА/N с дефицитом В-клеток ассоциирована с одновременным увеличением экспрессии генов хемокинов *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Gcsf*, а также гена рецептора к СХС хемокинам *Cxcr1* (Рисунок 41), которые, видимо, прямо или опосредованно регулируются В-лимфоцитами [Wengner A.M., et al., 2008]. Все это в свою очередь приводит к тому, что нейтрофилы быстро фагоцитируют бактерии BCG (Рисунок 42 Б) и, вероятно, экранируют их от

профессиональных антигенпрезентирующих клеток – макрофагов и дендритных клеток – инициирующих формирование адаптивного иммунного ответа. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что нейтрофилы способны презентировать антигены патогенов в контексте молекул МНСII и активировать Т-лимфоциты [Li Y., et al., 2019], однако в отношении микобактерий такой активности не обнаружено.

Для проверки гипотез о негативном влиянии нейтрофилов на формирование иммунного ответа при вакцинации и вовлечении В-клеточного звена в этот процесс мы провели исследования формирования иммунного ответа на вакцину BCG у мышей CBA/N на фоне удаления нейтрофилов или восстановления В-клеток. Действительно, удаление нейтрофилов за сутки до иммунизации способствует формированию вакцинного эффекта BCG (Рисунок 43), что выразилось достоверном снижении микобактериальной нагрузки в легких и селезенки у зараженных вакцинированных мышей CBA/N по сравнению с контрольными животными. С другой стороны, восстановление популяции В-лимфоцитов у мутантных животных приводит к замедлению скорости миграции нейтрофилов в место введения бактерий BCG (Рисунок 39), и также восстанавливает способность мышей CBA/N к вакцинации против ТБ (Рисунок 37). Это выражается в снижении числа микобактерий в легких и селезенке (Рисунок 37 Г, Д) и увеличении продолжительности жизни (Рисунок 37 Б) вакцинированных и затем зараженных животных. Один из возможных механизмов взаимодействия нейтрофилов и В-клеток был предложен в работе Kozakiewicz с коллегами (2013). Они продемонстрировали, что В-лимфоциты влияют на миграцию нейтрофилов при ТБ и вакцинации BCG за счет подавления продукции IL-17 Т-лимфоцитами Th17. Однако, как отмечают сами авторы, есть и другой возможный способ воздействия В-лимфоцитов на нейтрофилы, поскольку различия в миграции нейтрофилов у лишенных В-клеток мышей $V^{-/-}$ и мышей дикого типа B6, наблюдается еще до формирования адаптивного ответа лимфоцитов Th17 [Kozakiewicz L., et al., 2013]. Вероятно, такая регуляция может быть обусловлена продукцией В-клетками IL-35. В одной из недавних работ показано, что при введении бактерий BCG в легких

увеличивается количество В-лимфоцитов, продуцирующих IL-35, что ассоциировано с уменьшением числа IL-17-продуцирующих лимфоцитов Th17 [Chen C., et al., 2020].

Как отмечено выше, помимо физического экранирования микобактерий, сами нейтрофилы выполняют также и функцию регуляторов воспаления. Они продуцируют множество хемокинов, цитокинов и других медиаторов воспаления, пролонгируя воспалительный процесс и образуя таким образом петлю положительной обратной связи [Petrofsky M., et al., 1999, Riedel D. D. and Kaufmann S. H., 1997, Sawant K. V. and McMurray D. N., 2007]. В дополнение к этому, мы показали, что лёгочные нейтрофилы при ТБ (а также перитонеальные нейтрофилы при неспецифическом воспалении) производят большое количество внеклеточного тимидина (Рисунки 7-9). Этот факт необходимо учитывать при постановке пролиферативных тестов с участием нейтрофилов, и исключить метод оценки пролиферации по включению радиоактивного [³H]-тимидина. До конца роль этого явления не ясна, но выделяемый в больших количествах тимидин, один из четырёх нуклеозидов ДНК, может быть частью нейтрофильных ловушек NETs, выбрасываемых при взаимодействии с микобактериями [Francis R.J., et al., 2014, Воробьева Н.В. 2020; Cavalcante-Silva L.H.A., et al., 2023]. Предполагается, что NETs способствуют физическому задержанию микобактерий и ограничивают их распространение в другие органы [Braian C., et al., 2013]. Считается также, что выброс NETs нейтрофилами способствует концентрации антимикробных факторов [Brinkmann V., et al., 2004, Papaianopoulos V., Zychlinsky A., 2009]. Наконец, взаимодействие NETs с рецепторами TLR7/TLR9 на поверхности плазмоцитоподобных дендритных клеток (pDC) способствует продукции последними больших количеств интерферонов 1-ого типа [Lande R., et al., 2011], что приводит к развитию патологии при ТБ [Moreira-Teixeira L., et al., 2018; Kotov D.I., et al., 2023]. Поскольку мы обнаружили что даже при неспецифическом воспалении, вызванном раствором пептона, нейтрофилы также секретируют большие количества тимидина, такой эффект в легких может быть свидетельством в том числе массовой гибели и дегрануляции нейтрофилов при массивном воспалении.

Многогранная роль нейтрофилов при взаимодействии с микобактериями была ранее изучена в разных аспектах. Было показано, что нейтрофилы усиливают миграцию дендритных клеток в лимфоузлы, а также доставляют бактерии для вторичного фагоцитоза другими клетками, способствуя таким образом кросс-презентации и модифицируя ответ Т-лимфоцитов [Aleman M., et al., 2005, Blomgranand R., Ernst J.D., 2011]. При внутрикожном введении BCG, нейтрофилы фагоцитируют микобактерии и доставляют их в дренирующие ЛУ [Abadie V., et al., 2005]. При этом, совсем не обязательно, что эти события имеют положительное влияние на формирование эффективного иммунного ответа против ТБ. Фагоцитоз макрофагами нейтрофилов, содержащих микобактерии, приводит к формированию большого количества липидных телец и интенсивной продукции простагландина E2 и TGF- β , подавляющих активацию Т-лимфоцитов [D'Avila H., et al., 2008]. Кроме того, взаимодействие дендритных клеток с нейтрофилами, ушедшими в апоптоз после поглощения микобактерий, приводит к ухудшению презентации антигенов и последующей активации Т-лимфоцитов [Aleman M., et al., 2007]. В совокупности с полученными нами данными нейтрофилы можно определить, как патогенный фактор при ТБ и вакцинации BCG против ТБ. В зависимости от генетики хозяина, они могут быть более или менее устойчивы к развитию некроза после фагоцитирования микобактерий, что в свою очередь влияет на эффективность развития последующего иммунного ответа и регуляцию воспаления.

Другая «неканоническая» в борьбе с ТБ популяция клеток – это В-лимфоциты. Несмотря на традиционную точку зрения о слабом участии В-лимфоцитов в иммунном ответе на внутриклеточные инфекции, в последние десятилетия этот взгляд стал меняться. Показано, что В-клетки принимают активное участие в ответе и на внутриклеточные патогены, такие как *Legionella pneumophila* [Joller N., et al., 2010, Weber S., et al., 2012], *Coxiella burnetii* [Peng W., et al., 2014], *Brucella abortus* [Gomez G., et al., 2013; Hoffmann E., Houle J., 1995; Winter A., et al., 1989] и микобактерии. При микобактериальных инфекциях В-лимфоциты мигрируют в легкие и формируют там В-фолликулы [Gonzalez-Juarrero

M., et al., 2001, Ulrichs T., et al., 2004, Tsai M.C., et al., 2006, Slight S.R., et al., 2013], обладающие всеми признаками фолликулов вторичных лимфоидных органов. В их состав входят фолликулярные Т-хелперы T_{fh} CXCR5⁺, фолликулярные дендритные клетки, образуются зародышевые центры, а также венулы высокого эндотелия [Kahnert A., et al., 2007, Maglione P.J., et al., 2007, Slight S.R., et al., 2013]. Очевидно, что В-лимфоциты, формирующие подобные скопления в легких, принимают участие в иммунном ответе на туберкулезную инфекцию, однако их роль, обсуждаемая в литературе, до сих пор неоднозначна.

В целом, образование эктопических В-фолликулов характерно для многих воспалительных процессов, вызванных разнообразными патогенами: мышинным вирусом герпеса [Kocks J.R., et al., 2009], вирусом гриппа [Moynon-Quiroz J.E., et al., 2004], модифицированным вирусом коровьей оспы Анкара (MOA) [Halle et al., 2009], микобактериями [Ulrichs T., et al., 2005, Ulrichs T., et al., 2004, Phuah J.Y., et al., 2012, Gonzalez-juarrero M., et al., 2001, Kondratieva E., et al., 2010, Slight S.R., et al., 2013], а также вследствие развития аутоиммунных и онкологических заболеваний [Jones G. and Jones S., 2015, Pitzalis C., et al., 2014].

В зависимости от природы воспаления, генетики патогена и хозяина В-лимфоциты и формирующиеся В-фолликулы могут играть разные роли. Фенотип В-лимфоцитов, формирующий В-фолликулы, также не одинаков при разных воспалениях. Так, при аллергии, вызванной у мышей BALB/C грибами *Aspergillus fumigatus*, в легкие мигрируют лимфоциты B2 CD19⁺CD23⁺ [Ghosh S., et al., 2012]. Образующиеся В-фолликулы в ткани кишечника в основном состоят из лимфоцитов CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi}CD23⁺ [Hamada H., et al., 2002].

Мы исследовали В-лимфоциты легких и плевральной полости, мест непосредственного присутствия микобактерий при ТБ. В плевральной полости происходит накопление лимфоцитов B2 по мере развития ТБ (Рисунок 16). Вместе с тем соотношение популяций В-лимфоцитов в легких практически не меняется в ходе развития инфекционного процесса. Примерно 15% В-лимфоцитов в легких составляют лимфоциты B1 CD19⁺B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}, 85% лёгочных В-клеток по поверхностному фенотипу CD19⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi}CD21/35^{int}CD1d⁻CD5⁻CD11b⁻

CD43⁻ сходны с лимфоцитами В2, за исключением экспрессии низкоаффинного рецептора к IgE CD23. Экспрессия маркера В2-лимфоцитов CD23 на В-лимфоцитах в легких отличается у разных линий мышей (В6 – CD23^{hi}, I/St – CD23^{mid}, СВА – CD23^{lo}, Рисунок 17). Этому способствует как минимум два фактора. Во-первых, генетические особенности исследуемых линий. Уровень CD23 различается на В-лимфоцитах IgM^{lo}IgD^{hi} селезенки интактных мышей В6, I/St и СВА (данные не приведены), что свидетельствует о влиянии неких генетических факторов. Вместе с тем McDonald с соавторами предположили, что экспрессия CD23 на В-клетках зависит от степени активации лимфоцитов [McDonald K.G., et al., 2005]. Авторы показали, что стимуляция В-клеток, выделенных из В-фолликулов кишечника, приводит к переключению фенотипа с CD69^{lo}CD86^{lo}CD23^{hi} на CD69^{hi}CD86^{hi}CD23^{lo}. В нашем исследовании легочные В-клетки с высокой экспрессией CD23 имеют низкий уровень экспрессии активационного маркера CD80 и наоборот (Рисунок 17Б), при общей низкой экспрессии другого активационного маркера CD69. Кроме того, мы показали, что В-лимфоциты, мигрирующие в плевральную полость, теряют маркер CD23 на своей поверхности по мере развития инфекционного процесса (Рисунок 17А). Таким образом, уровень экспрессии CD23 зависит и от генетических особенностей, и от уровня активации В-клеток.

В-лимфоциты могут продуцировать антитела, секретировать различные цитокины, а также выступать в качестве антиген-презентирующих клеток [Lund F.E., Randall T.D., et al., 2014, Лушова А. А., и др., 2019]. Мы показали, что при ТБ легочные В-лимфоциты выполняют все основные свойственные им функции. Полученные нами данные действительно свидетельствуют о том, что легочные В-клетки служат АПК для Т-лимфоцитов при ТБ. Во-первых, В- и Т-лимфоциты CD4⁺ пролиферируют в ткани легкого внутри В-фолликулов в непосредственной близости друг от друга (Рисунок 15), что вероятнее всего свидетельствует о распознавании Т-клетками микобактериальных антигенов в контексте молекул МНСII на поверхности В-клеток и последующей активации последних. Во-вторых, уровень экспрессии молекул МНСII на поверхности легочных В-клеток

увеличивается по мере развития инфекционного процесса и сопоставим с таковым на В-клетках селезенки (Рисунок 18А). И, наконец, легочные В-лимфоциты эффективно презентуют микобактериальные антигены специфическим Т-лимфоцитам и стимулируют их к пролиферации *in vitro* (Рисунок 18Б). Показано, что В-лимфоциты являются важными для презентации антигена, когда антигенная нагрузка низка [Lund F.E., Randall T.D., 2014]. Внутри В-фолликулов практически не обнаруживаются микобактерии [Ulrichs T., et al., 2004], однако В-лимфоциты могут презентировать секретируемые антигены микобактерий. Возможно, что в подобных условиях В-клетки могут быть важным звеном в обеспечении эффективного иммунного ответа посредством презентации антигенов фолликулярным Тfh-лимфоцитам, необходимым для правильной локализации и активации макрофагов [Slight S.R., et al., 2013].

Легочные В-лимфоциты при ТБ продуцируют различные цитокины [Chan J., et al., 2014, Phuah J., et al., 2016], среди которых можно отметить интерфероны первого типа, направляющие поляризацию макрофагов по противовоспалительному пути М2 [Benard A., et al., 2018]. Наши результаты показали, что при ТБ легочные В-клетки секретируют в больших количествах провоспалительные цитокины IL-6 и IL-11, в небольших количествах TNF- α , но не IFN- γ и IL-10 (Рисунок 18). IL-6 один из основных провоспалительных цитокинов, обладающих плеiotропным действием. С одной стороны, IL-6 необходим для контроля микобактериальной инфекции и формирования гранулем на ранних стадиях после инфицирования [Ladel C., et al., 1997, Saunders V.M., et al., 2000]. Однако, переизбыток IL-6 приводит к гипервоспалению по мере прогресса инфекции [Nagabhushanam V., et al., 2003, Martinez A.N., et al., 2013]. Роль IL-11 в иммунном ответе против туберкулеза до конца не ясна. Однако данные нашей лаборатории свидетельствуют скорее о патогенной роли этого цитокина [Karina M.A., et al., 2011, Shepelkova G., et al., 2016].

Проведенное нами исследование животных В-IL-6КО с избирательным исключением гена *Il6* в В-клетках показало, что такие мыши более чувствительны к ТБ (Рисунок 23), что выражается в уменьшении продолжительности их жизни.

Мы показали, что В-лимфоциты являются одним из основных источников продукции ИЛ-6 в легких на ранних сроках после инфицирования, поскольку выключение гена этого цитокина только в В-клетках приводит к снижению количества РНК-транскриптов в 10 раз, по сравнению с контрольными животными (Рисунок 24 Б). Это, в свою очередь, приводит к нарушению специфического ответа Т-лимфоцитов на ранних сроках после заражения, что выражается в снижении числа Т-клеток CD4⁺, продуцирующих IFN- γ и ИЛ-17 в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами (Рисунок 25). Кроме того, дефицит ИЛ-6 в В-клетках ассоциирован с уменьшением числа важных в ответе против ТБ фолликулярных Т-лимфоцитов T_hCXCR5⁺ [Slight S.R., et al., 2013] в легких и селезенке и снижением экспрессии гена цитокина ИЛ-21 (Рисунок 26). Эти изменения приводят к повышению чувствительности к ТБ мышей с дефицитом ИЛ-6 в В-клетках (Рисунок 23), что свидетельствует о важности В-клеток как источника ИЛ-6 для сдерживания инфекции. Ранее было показано, что ИЛ-6 необходим для дифференцировки наивных T_h лимфоцитов [Nurieva R.I., et al., 2008]. В соответствии с этим наше исследование демонстрирует необходимость ИЛ-6 и, в частности, производимого В-клетками ИЛ-6, для формирования T_h лимфоцитов при инфекции. Было также показано, что ИЛ-6 В-клеток способствует спонтанному формированию зародышевых центров при системной красной волчанке, а его дефицит в В-клетках отменяет формирование аутоантител и таким образом препятствует формированию системного аутоиммунитета [Arkatkar T., et al., 2013]. Интересно, что IFN- γ служил одним из активаторов продукции ИЛ-6 В-клетками [Arkatkar T., et al., 2013]. Учитывая, что IFN- γ является одним из ключевых цитокинов в противомикобактериальном иммунитете, секреция IFN- γ и ИЛ-6 Т- и В-лимфоцитами, соответственно, может способствовать взаимной активации этих типов клеток.

Поскольку мыши ИЛ-6КО, полностью лишённые ИЛ-6, более чувствительны к ТБ, чем В-ИЛ-6КО (Рисунок 23 А), а на поздних сроках заражения отсутствие продукции ИЛ-6 В-клетками в меньшей степени влияет на общий уровень

экспрессии гена *il6* (Рисунок 24 Б), вопрос о том, какие именно клетки являются более важным источником IL-6, остается открытым. Насколько важна роль конкретных клеток в продукции того или иного цитокина при ТБ, хорошо иллюстрирует ситуация с TNF- α . Продукция TNF- α Т-лимфоцитами крайне необходима для контроля ТБ, тогда как продукция TNF- α макрофагами и нейтрофилами важна в первые недели после заражения, но не критична для контроля инфекции в хронической стадии [Allie N., et al., 2013]. В нашем исследовании TNF- α , продуцируемый В-лимфоцитами был необходим для формирования В-фолликулов в легких (Рисунок 21), но оказался не критичен для успешной борьбы с *M. tuberculosis* и *M. avium* в более поздние сроки (Рисунок 22).

Одна из основных функций В-лимфоцитов – это продукция антител. Вклад антител и Fc- γ -рецепторов в защитный или патогенный ответ на туберкулезную инфекцию описан во многих работах [Carpenter S.M., Lu L.L., 2022; Rijnink W.F., et al., 2021]. В одном из последних исследований показано, что у здоровых людей, постоянно находящихся в контакте с больными ТБ, обнаруживаются антитела, преимущественно IgG1, специфичные к микобактериальным антигенам [Lu L.L., et al., 2019, Li H., et al., 2017]. При этом в группе «резисторов» (от английского «resistant» - устойчивый), людей в постоянном контакте с инфекцией, но имеющих отрицательную реакцию на туберкулиновый тест и отсутствие продукции IFN- γ Т-лимфоцитами в ответ на микобактериальные АГ, специфичные АТ выявлялись в достоверно большем количестве, чем у латентных носителей. Несмотря на наличие специфичных к микобактериям антител в приведенных исследованиях во всех анализируемых группах (взрослые больные активным и латентным ТБ и медицинские работники в туберкулезной больнице), протективным эффектом обладали лишь АТ латентных носителей и здоровых доноров. Такие АТ отличались уровнем гликозилирования Fc-фрагментов и связывались с рецепторами FcR γ IIIa со значительно более высокой аффинностью [Li H., et al., 2017]. Кроме того, фагоцитоз опсонизированных такими антителами микобактерий повышал бактерицидные свойства макрофагов.

При этом стоит отметить, что в упомянутых работах проведены исследования АТ в сыворотке крови испытуемых. По-видимому, АТ крови, постоянно омывающей легочное пространство, осуществляют мониторинг инфекции. Исходя из того, что такие АТ выделяют из крови людей даже не болеющих ТБ, до конца не понятно, какой вклад в продукцию этих АТ вносят лёгочные В-клетки. В нашей работе мы использовали несколько подходов для анализа производимых легочными В-клетками иммуноглобулинов (Ig). В одном из исследований мы провели анализ АТ, секретлируемых *in vitro* В-клетками, выделенными из легких зараженных мышей, а также анализ гибридом, полученных из этих же В-клеток. По нашим данным при ТБ легочные В-лимфоциты производят АТ классов IgA, IgM, IgG, но не IgE. Интересно, что большая часть АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами мышей чувствительной к ТБ линии I/St, не имели специфичности ни к микобактериальным, ни к собственным антигенам (Таблица 1, 2), тогда как в крови этих же животных обнаруживались высокие титры специфичных к микобактериям АТ (Рисунок 19 Г).

Другим подходом к характеристике иммуноглобулинов легочных В-лимфоцитов в зараженном легком стал анализ репертуаров BCR и сопоставление последовательностей IGH и CDR3-районов, извлеченных из данных секвенирования РНК В-клеток мышей чувствительной и устойчивой линий I/St и В6, соответственно. Уровень соматического гипермутагенеза в легочных В-клетках, т.е. тонкая подстройка специфичности в процессе развивающегося иммунного ответа, у чувствительных животных I/St был ниже по сравнению с устойчивыми мышами В6 через 8 недель после заражения ТБ. В легочных В-клетках мышей I/St были выявлены некрупные кластеры преимущественно IgM и IgG клонотипов (Рисунок 20 Г). В сыворотке периферической крови этих же животных были выявлены более высокие титры АГ-специфичных АТ IgM и IgG (Рисунок 19 Г), из чего можно предположить, что АТ, локально генерируемые в легком, выходят в циркуляцию. Кроме того, более низкий уровень соматического гипермутагенеза в совокупности со значимо более высоким уровнем специфичных к микобактериям АТ IgM в крови чувствительных животных через 8 недель после

заражения ТБ могут свидетельствовать об отложенном или «отвлеченном» и менее эффективном ответе АТ, что может дополнительно вносить вклад в проявление чувствительного к ТБ фенотипа. Напротив, в легочных В-клетках устойчивых мышей В6 образовывались крупные АГ-ориентированные кластеры, преимущественно состоящие из клонотипов IgA (Рисунок 20). Более высокая степень соматического гипермутагенеза в В-клетках мышей резистентной линии свидетельствует о более активной подстройке генов иммуноглобулинов этих животных в ходе инфекционного процесса. В результате в легких этих животных генерируется больше специфичных к микобактериальным АГ В-лимфоцитов, что вносит дополнительный вклад в обеспечение устойчивого к инфекции фенотипа [Swanson R.V., et al., 2023]. Хорошо известно, что образование АТ изотипа IgA характерно для слизистых. Пассивная иммунизация IgA защищает от микобактериальной инфекции в модели аэрозольного и интраназального заражения ТБ на мышах [Williams A., et al., 2004, Balu S., et al., 2011]. В соответствии с нашими наблюдениями было показано, что дефицит IgA приводит к задержке адаптивного иммунного ответа на инфекцию *M. tuberculosis* [Tjärnlund A., et al., 2006], а мыши неспособные генерировать IgA неэффективно контролируют инфекцию на фоне снижения продукции IFN- γ и TNF Т-клетками [Torrado E., et al., 2013], что характерно для легочных Т-клеток мышей I/St [Logunova N., et al., 2015]. Кроме того, показано, что в зависимости от изотипа АТ могут по-разному проявлять ингибирующие функции в отношении микобактерий туберкулеза [Zimmermann N., et al., 2016]. Так, секреторный IgA может взаимодействовать с антигенами *M. tuberculosis* и предотвращать инфекцию эпителиальных клеток, что вероятно реализуется в легких мышей В6. Различия, которые мы наблюдали в профилях иммуноглобулинов между линиями мышей, могут иметь решающее значение для дальнейшей организации эффективного ответа у резистентных мышей или неэффективности иммунного ответа против *M. tuberculosis* у мышей I/St. Недавние исследования показали, что именно АГ-специфические В-клетки легких способствуют усилению выработки цитокинов и корректной локализации фолликулярных Tfh-подобных хелперов в легком

посредством взаимодействия между рецептором PD-1 и его лигандом PD-L1 на Tfh- и В-лимфоцитах, соответственно. Это обеспечивают контроль *M. tuberculosis* как у мышей, так и у макак [Swanson R.V., et al., 2023] за счет последующей эффективной активации макрофагов [Slight, et al., 2013].

Причины различий в формировании более или менее ориентированных на антигены микобактерий иммуноглобулинов в легких мышей устойчивой и чувствительной линий мышей В6 и I/St, соответственно, пока не ясны. Для продукции АГ-специфичных АТ необходимо взаимодействие с фолликулярными хелперами Tfh, распознающими тот же антиген. Различаются ли мыши В6 и I/St по общему количеству и специфичным к микобактериям Tfh в легком не известно. Вместе с тем мы установили, что репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR) Т-лимфоцитов CD4⁺, выделенных из зараженного ТБ легкого тех же, что и в случае с В-клетками, мышей I/St также менее сфокусирован в отношении микобактериальных АГ, по сравнению с Т-клетками мышей В6 [Tsareva A., et al., 2024]. Это позволяет предположить, что локальное окружение иммунных клеток в легких мышей чувствительной линии не оптимально для адекватной борьбы с *M. tuberculosis*.

В целом роль В-лимфоцитов и В-фолликулов однозначно оценить нельзя. Так, например, при различных онкологических заболеваниях легких наблюдается корреляция между формированием легочных В-фолликулов, усилением ответа Th1 и увеличением продолжительности жизни пациентов [Jones G.W., Jones S.A., 2015]. Напротив, при ревматоидном артрите формирование В-фолликулов ассоциировано с продукцией аутоиммунных антител и тяжестью течения заболевания [Jones G.W., Jones S.A., 2015]. При хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) В-клетки играют двойственную роль. С одной стороны, показано, что формирование В-фолликулов ассоциировано с развитием эмфиземы и, соответственно, более тяжелым течением болезни [John-Schuster G., et al., 2014]. Это опосредовано продукцией В-лимфоцитами IL-10, последующей стимуляцией макрофагов к продукции металлопротеиназ и увеличению альвеол [Owen C.A., et al., 2008]. С другой стороны, показано, что при обострении ХОБЛ В-клетки способствуют

протекции [Polverino F., et al., 2016]. При микобактериальных инфекциях В-лимфоциты, по-видимому, тоже играют неоднозначную роль. Мы показали, что при заражении *M. avium*, большее количество В-фолликулов в легких ассоциировано с чувствительным фенотипом. Проведя сегрегационный анализ, мы показали, что число В-фолликулов прямо коррелирует с количеством микобактерий в легких, что контролируется экспрессией чувствительного аллеля гена *Slc11a1* (Рисунок 29 А), кодирующего протонную помпу двухвалентных катионов в фагосомах макрофагов. Подобную картину можно объяснить несколькими факторами. С одной стороны, экспрессия устойчивого аллеля гена *Slc11a1* и образование соответствующего белка ограничивает доступ питания для *M. avium* в фаголизомы макрофагов. В дополнение к этому, в отличие от вирулентных микобактерий *M. tuberculosis*, микобактерии *M. avium* не обладают генетическим аппаратом, позволяющим им выходить из фагосом в цитозоль с неограниченным доступом к питанию, что способствует эффективному ответу клеток врожденного иммунитета. Экспрессия устойчивого аллеля гена *Slc11a1* видимо способствует эффективному процессингу микобактериальных антигенов и последующей активации Т-лимфоцитов, что в свою очередь обеспечивает формирование своевременного иммунного ответа против *M. avium*, при котором В-фолликулы в легких устойчивых животных не успевают формироваться или формируются в достоверно меньшем количестве (Рисунок 29).

При заражении вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv мышей с разной генетически обусловленной чувствительностью к ТБ наблюдается другая картина. У животных обеих линий в легких формируются В-фолликулы и разница в формировании этих структур четко заметна на поздних стадиях развития инфекции (Рисунок 13). У чувствительной линии мышей I/St по мере развития ТБ (12-14 недель после заражения) В-клетки постепенно уходят, и В-фолликулы рассасываются, что сопровождается диссеминированным воспалением и образованием некротических очагов. В то же время, у устойчивых мышей В6 В-фолликулы сохраняются длительное время и в хронической стадии развития заболевания. Через полгода после инфицирования обнаруживаются крупные В-

фолликулы, а также большое количество В-клеток, рассеянных в ткани легкого (Рисунок 14).

Мы предположили, что длительное сохранение В-фолликулов может быть ассоциировано со сдерживанием воспаления. Мы оценили экспрессию некоторых генов воспалительных цитокинов (IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α) у мышей обеих исследуемых линий при ТБ и показали, что у мышей чувствительной линии I/St развитие воспаления происходит более медленно, но экспрессия генов постоянно нарастает по ходу развития инфекционного процесса (для цитокинов IL-1a, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α), тогда как для мышей устойчивой линии характерно быстрое увеличение числа транскриптов в первые недели после заражения, с постепенным снижением или поддержанием на том же уровне в хронической стадии заболевания (Рисунок 30).

Роль IL-1 в иммунном ответе против ТБ зависит от стадии развития иммунного ответа. Двойной нокаут генов *Il1a* и *Il1b* или выключение гена рецептора к IL-1 (мыши IL1R^{-/-}) приводит к тому, что такие животные не способны сдерживать микобактериальную инфекцию [Bourigault M.L., et al., 2013]. При этом показано, что IL-1 крайне необходим на начальных этапах ТБ, но оказывает губительное действие в хронической стадии развития инфекции. Полученные нами данные о более высокой экспрессии генов цитокинов IL-1 α и IL-1 β на раннем сроке после заражения у мышей устойчивой линии В6 соотносятся с известной важностью этих цитокинов для активации альвеолярных макрофагов [Cohen S., et al., 2018] и последующего формирования гранул при ТБ. При этом более высокий уровень экспрессии генов этих цитокинов через 12 недель после заражения ТБ у мышей I/St соотносится с влиянием гиперпродукции IL-1 в хронической стадии развития инфекционного процесса на развитие патологии [Bourigault M.L., et al., 2013]. Кроме того, показана четкая ассоциация чрезмерной одновременной продукции IL-1 β и TNF- α с образованием каверн и деструкцией ткани легкого на поздних стадиях у больных активным ТБ [Stek C., et al., 2018], что соотносится с наблюдаемой нами патологией у мышей чувствительной линии I/St. При этом уровень этих цитокинов снижается при эффективном лечении пациентов

[Stek C., et al., 2018], а блокада IL-1 в процессе активного ТБ в модели на мышах и макаках приводит к снижению общего воспаления и, в частности, к снижению притока нейтрофилов в легкие [Winchell C.G., et al., 2020]. В опытах на мышах показано, что важен некий средний уровень продукции IL-1 β и TNF- α , поскольку слишком высокий или слишком низкий уровень этих цитокинов ассоциирован с деструкцией лёгочной ткани [Bekker L., et al., 2000, Tobin D., et al., 2012].

Роль IL-17 в ответе на туберкулезную инфекцию также неоднозначна. С одной стороны, показано, что при вакцинации BCG IL-17 способствует быстрому ответу лимфоцитов Th1 на антигены в периферических тканях [Khader S.A., et al., 2007, Gopal R., et al., 2012]. С другой стороны, хорошо известна патологическая роль IL-17 [Jones C.E., Chan K., 2002], как провоспалительного цитокина и хемоаттрактанта нейтрофилов [Ouyang W., et al., 2008, Torrado E., Cooper A.M., 2010]. Показано также, что входящие в состав мелких капилляров клетки пирциты под действием IL-17 и/или TNF- α стимулируют нейтрофилы человека к продукции цитокинов IL-1 α , IL-1 β , TNF- α и IL-8 (CXCL8) [Liu R., et al., 2016], что дополнительно привлекает сами нейтрофилы. Таким образом, нейтрофилы провоцируют и пролонгируют воспаление на поздних стадиях развития ТБ. Применительно к В-клеткам, показано, что при ТБ и вакцинации BCG В-лимфоциты снижают нейтрофилию, опосредованную ответом Th17/IL-17 [Kozakiewicz L., et al., 2013]. Удаление В-лимфоцитов на ранней стадии развития инфекционного процесса в модели ТБ на макаках также приводит к повышению ответа Th17 [Phuah J., et al., 2016], а у больных ТБ описана популяция В-лимфоцитов CD19⁺CD1d⁺CD5⁺, подавляющая ответ Th17 [Zhang M., et al., 2012].

Одними из возможных ингибиторов провоспалительных цитокинов могут быть продуцируемые легочными В-лимфоцитами интерфероны 1-ого типа [Mayer-Barber K.D., et al., 2011, Benard A., et al., 2018], IL-35 и IL-10 [Chen C., et al., 2020]. Поскольку Benard с соавторами [2018] показали, что IFN I типа – это одни из основных цитокинов, продуцируемых В-лимфоцитами при ТБ, то снижение продукции IL-1 за счет большого количества В-клеток и фолликулов в хронической стадии ТБ у мышей B6 весьма вероятно. Однако подтверждение этой концепции и

поиск других возможных ингибиторов воспаления со стороны В-клеток требует дальнейшего исследования.

В соответствии с предположением о сдерживающей воспалению и развитие туберкулезной инфекции роли В-клеток и В-фолликулов в легких мы решили проверить повлияет ли удаление В-клеток в хронической стадии развития ТБ у устойчивых животных на течение инфекции. Для этого мы ввели элиминирующие мАТ против CD20 мышам линии В6 через 16 недель после заражения. Действительно, оказалось, что удаление В-клеток в хронической стадии ТБ приводит к повышению чувствительности к развитию ТБ. Это выражалось в увеличении числа микобактерий в легких, более быстрой потере массы тела, а также сокращению времени жизни мышей с удаленными В-лимфоцитами по сравнению с контрольными зараженными мышами В6 (Рисунок 32). Интересно, что в исследовании по удалению В-лимфоцитов за несколько дней до заражения ТБ и в начале развития инфекции у макак не наблюдалось разницы в микобактериальной нагрузке во всем легком, однако было выявлено значимое увеличение числа микобактерий на уровне отдельных гранулем [Phuah, et al., 2016], что свидетельствует о неоднородности иммунных реакций в различных локациях в легком.

Как отмечено выше у мышей В6, инфицированных туберкулезом, В-клетки локализуются преимущественно в В-фолликулах, но также рассеяны в паренхиме легких. И у больных ТБ, и в инфицированных ТБ животных в состав В-фолликулов также входят Т-лимфоциты CD4⁺ и CD8⁺ [Ulrichs T., 2004; Slight 2013; Рисунок 15Б, В]. Поскольку В-фолликулы могут служить эффективной структурой для активации Т-клеток даже у животных без вторичных лимфоидных органов [Day T.A., et al., 2010], а введение элиминирующих В-клетки АТ привело практически полному расформированию В-фолликулов (Рисунок 31Б), мы оценили влияние истощения В-клеток на популяции Т-лимфоцитов. К нашему удивлению, дефицит В-клеток не повлиял на размер популяции Т-лимфоцитов CD4⁺ и специфическую продукцию ими цитокинов в ответ на стимуляцию АГ микобактерий *in vitro* (Рисунок 33). Напротив, удаление В-клеток привело к росту популяции Т-клеток

CD8⁺, что сопровождалось снижением относительного количества лимфоцитов, специфически продуцирующих TNF- α и IL-17 (Рисунок 34). Эти результаты согласуются с наблюдениями в модели ТБ на лишенных В-клеток мышей В^{-/-}, у которых наблюдался неизменный ответ Т-клеток CD4⁺, но повышенная инфильтрация легких Т-лимфоцитами CD8⁺ [Maglione, et al., 2007]. В исследовании в модели ТБ на макаках истощение В-клеток приводило к несколько иным результатам. Так было отмечено изменение местных Т-клеточных и цитокиновых реакций, что выражалось в повышенной частоте Т-лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих IL-2, IL-10 и IL-17, с параллельным снижением уровней IL-6 и IL-10 на уровне отдельных гранул [Phuah, et al., 2016]. Подобные разногласия могут проявляться опять же вследствие того, что В-лимфоциты не одинаково функционируют до, в начале и в прогрессирующей стадиях развития инфекционного процесса. Вполне возможно, на фоне полностью установившегося Т-клеточного иммунитета, как в случае проведенного нами эксперимента, взаимодействие между В-клетками и Т-лимфоцитами CD4⁺ менее критично и его локальное обслуживание снижается.

Интересно, что в нашем исследовании истощение В-клеток в хронической стадии туберкулезной инфекции привело к увеличению экспрессии в легочной ткани генов нейтрофил-ассоциированного иммунного ответа: генов хемоаттрактантов нейтрофилов CXCL1 и IL-17, повреждающих ткани металлопротеиназ MMP8 и MMP9 и регулирующего воспаление белка S100A8 (Рисунок 35). Белок S100A8 продуцируется нейтрофилами, образует димер S100A8/A9 и опосредует дополнительное привлечение нейтрофилов, воспаление и усугубление патологии легких при ТБ [Gopal R., et al., 2013; Scott N.R., et al., 2020]. Кроме того показано, что мыши с генетическим нокаутом гена *S100a9* (S100A9-КО) лучше контролируют хроническую инфекцию ТБ, вызванную клиническими изолятами *M.tuberculosis* HN878 и HN563. Интересно, что повышенная устойчивость к ТБ у мышей S100A9-КО была ассоциирована с большим числом легочных В-фолликулов в хронической стадии инфекции [Scott N.R., et al., 2020], что является косвенным доказательством вовлечения этих структур в сдерживание

развития инфекции. Это также соотносится с различиями в уровне формирования В-фолликулов у мышей B6 разного пола. Показано, что у самок большее число В-фолликулов в ткани легкого ассоциировано с лучшим контролем микобактерий на поздних сроках развития ТБ [Hertz D., et al., 2020].

Наконец, повышение экспрессии генов ассоциированных с нейтрофилами металлопротеиназ *Mmp8* и *Mmp9* является еще одним показателем усугубления патологии после удаления В-лимфоцитов. MMP8 и MMP9 опосредуют разрушение матрикса при легочном ТБ и способствуют последующему формированию фиброза [Ong C.W., et al., 2015]. В противовес полученным нами данным, в нескольких недавних исследованиях было показано, что собственно В-клетки могут стимулировать формирование фиброзной ткани при IgG4-ассоциированном воспалении, возникающем после лечения Ритуксимабом (химерное моноклональное антитело мыши/человека, которое специфически связывается с трансмембранным антигеном CD20 и элиминирует В-лимфоциты) [Della-Torre E., 2020], или в легких у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом [Ali M.F., et al., 2021]. В наших исследованиях мы наблюдали обратный эффект. Если при идиопатическом легочном фиброзе фибробласты непосредственно проникают в зону В-клеточных фолликулов, то у мышей и устойчивой, и резистентной линий в легких при ТБ области фиброза и В-фолликулов четко разделены [Linge I., et al., 2023]. Это еще раз подтверждает разнонаправленность действия В-клеток в зависимости от типа и локализации воспаления и природы патогена. Полученные нами данные являются еще одним свидетельством того, что В-лимфоциты и образующиеся при ТБ в легком В-фолликулы подавляют нейтрофил-ассоциированное воспаление и способствуют сдерживанию инфекции.

Итак, традиционно не считающиеся основными в противотуберкулезном ответе В-лимфоциты и нейтрофилы, тем не менее, вносят большой вклад в иммунный ответ на микобактерии. В модели вакцинации BCG и заражения туберкулезом нами получены свидетельства патогенной роли нейтрофилов. Миграция в первые моменты в область проникновения патогена и быстрый фагоцитоз микобактерий приводит к тому, что нейтрофилы, плохо убивающие

микобактерии, экранируют их от других профессиональных фагоцитов, макрофагов, способных эффективно элиминировать патоген и активировать адаптивный иммунный ответ. Помимо этого, в хронической стадии развития инфекции нейтрофилы сами провоцируют излишнее воспаление и способствуют деструкции окружающей ткани легкого. Нейтрофилы, таким образом, играют роль «Троянского коня» в иммунном ответе на микобактерии. Одними из клеток, участвующих в торможении миграции нейтрофилов, являются В-лимфоциты. Если при инфекции, вызванной менее вирулентными микобактериями *M. avium*, массивное образование В-фолликулов ассоциировано с чувствительным фенотипом, то при туберкулезе, опосредованном заражением высоковирулентными микобактериями *M. tuberculosis*, длительное сохранение в легочной ткани устойчивых животных В-фолликулов, состоящих из специфических к микобактериальным АГ В-лимфоцитов, ассоциировано с меньшим воспалением, сдерживанием образования некротических очагов и подавлением инфекции. Таким образом, при ТБ сохранение В-фолликулов в легком можно рассматривать как индикатор более эффективного иммунного ответа, а удаление умирающих и зараженных нейтрофилов должно способствовать защите окружающих тканей и снижению воспаления.

6. Заключение

Данная работа посвящена исследованию В-лимфоцитов и нейтрофилов, «неканонических» участников иммунного ответа на микобактерии с различной вирулентностью – менее вирулентные *M. avium* и высоковирулентные *M. tuberculosis* – в моделях на мышах с различной генетически-обусловленной чувствительностью к соответствующим инфекциям.

Исходя из данных, полученных нами и в других лабораториях, роль нейтрофилов в ответе на инфекцию зависит от генетики и патогена, и хозяина. Мы исследовали конгенные линии В100 и В139, отличающихся β-цепью молекулы H2-А класса II, с общей генетической основой от мышей В6. Мыши В6 и полученные рекомбинантные линии несут s аллель гена *Slc11a1*, кодирующего оперирующий в фагосомах макрофагов белок и обеспечивающий чувствительность к инфекции *M. avium*. Оказалось, различия в МНСII вносят дополнительный вклад восприимчивость к инфекции. Вместе с тем, данные анализа инфильтрации легких нейтрофилами и исследование их функций позволили заключить, что при заражении маловирулентными микобактериями ранняя инфильтрация ткани легкого нейтрофилами отражает лишь динамику воспалительного процесса, но не вносит дополнительный вклад в восприимчивость к инфекции.

Напротив, в модели заражения туберкулезом опозитных по чувствительности мышей линий I/St и В6 мы обнаружили, что удаление нейтрофилов в первые дни после инфицирования *M. tuberculosis* приводит к снижению патологии легких, замедляет размножение патогена в легких и селезёнке и увеличивает продолжительность жизни чувствительных мышей I/St. Это сопровождается повышением продукции IFN-γ Т-лимфоцитами мышей I/St, что свидетельствует о негативном влиянии нейтрофилов на продукцию этого защитного цитокина. Удаление нейтрофилов на ранней стадии инфекции оказывало положительное влияние на ее течение, даже несмотря на то, что популяция нейтрофилов довольно быстро восстанавливается. Это свидетельствует

о патогенной роли нейтрофилов и важности первых стадий развития заболевания для правильного формирования защитного иммунного ответа при ТБ.

Мы продемонстрировали и другой пример патогенной роли нейтрофилов при регуляции ответа на микобактерии. У мышей линии CBA/N-xid с дефицитом В-лимфоцитов формированию защитного эффекта вакцины *M. bovis* BCG препятствует быстрый приток нейтрофилов в место введения вакцины, авирулентных микобактерий, которые немедленно поглощаются нейтрофилами. Динамика миграции нейтрофилов мышей CBA/N-xid была ассоциирована с резким возрастанием уровня экспрессия генов хемокинов *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Gcsf*, а также рецептора к СХС-хемокинам, по сравнению с родительской линией CBA. Поскольку основной дефект иммунной системы у мышей xid состоит в дефиците В-лимфоцитов, возник вопрос, действительно ли В-клетки принимают участие в регуляции миграции нейтрофилов. В подтверждение гипотезы о негативном влиянии нейтрофилов на формирование вакцинного эффекта BCG и участия В-лимфоцитов в этом процессе мы показали *in vivo*, что либо удаление нейтрофилов, либо перенос предшественников В-лимфоцитов мышам xid перед иммунизацией восстанавливает вакцинный эффект BCG. Это выразалось в достоверном снижении количества микобактерий в легких и селезенке после заражения вакцинированных мышей и увеличении продолжительности их жизни.

В дополнение к имеющимся данным о регуляторной функции нейтрофилов и путях их взаимодействия с другими клетками иммунной системы мы показали, что нейтрофилы производят большое количество внеклеточного тимидина. Это может быть свидетельством образования нейтрофильных ловушек (NETs), а также массовой гибели и дегрануляции нейтрофилов при воспалении. Этот факт должен учитываться при постановке пролиферативных тестов с клеточными популяциями, в которых присутствуют нейтрофилы, и исключить метод оценки пролиферации по включению радиоактивного [³H]-тимидина для таких случаев.

Общеизвестно, что нейтрофилы играют решающую роль в защите хозяина от множества бактериальных и грибковых инфекций, в пользу чего свидетельствует повышенная восприимчивость к рецидивирующим инфекциям у людей с тяжелой

врожденной нейтропенией или наследственными дефектами нейтрофилов. Вместе с тем чрезмерная или неадекватная активация нейтрофилов, способствует повреждению тканей не только при ТБ, но и при инфекциях и воспалениях неинфекционной природы. Так, нейтрофилы оказывают патогенное действие при респираторном дистресс синдроме, ХОБЛ, муковисцидозе, при некоторых формах астмы, нейродегенеративных заболеваниях [Németh T., et al., 2020]. В последние годы разрабатывается все больше терапевтических стратегий, нацеленных на подавление нейтрофильного воспаления либо путем уменьшения количества собственно нейтрофилов, либо путем подавления их функциональной активности. В связи с этим накопление знаний о патогенной роли нейтрофилов при ТБ, а также опыт применения нейтрофил-ассоциированной терапии при других заболеваниях должны способствовать разработке новых подходов к вспомогательной противотуберкулезной терапии.

Обнаруженное нами влияние В-лимфоцитов на формирование иммунного ответа на вакцину BCG побудило нас к более подробному изучению роли этой популяции клеток в ответе на микобактерии, тем более что мнение научного сообщества о роли В-клеток в ответе на внутриклеточные инфекции неоднозначно.

Мы исследовали В-лимфоциты легких и плевральной полости, т. е. места непосредственной локализации микобактерий при легочном ТБ и ближайшего окружения. В плевральной полости по мере развития ТБ происходит накопление лимфоцитов В2. Вместе с тем, соотношение популяций В-лимфоцитов В1:В2 в легких практически не меняется в ходе развития инфекционного процесса и составляет примерно 15% лимфоцитов В1 с фенотипом CD19⁺B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo} и 85% клеток с фенотипом CD19⁺B220^{hi}IgM^{lo}IgD^{hi}CD21/35^{int}CD1d⁻CD5⁻CD11b⁻CD43⁻, сходных с лимфоцитами В2 за исключением экспрессии низко аффинного рецептора CD23 к IgE. Экспрессия маркера CD23 не одинакова на В-клетках селезенки интактных мышей разных линий (B6 – CD23^{hi}, I/St – CD23^{mid}, CBA – CD23^{-/lo}), а также теряется на В-лимфоцитах в легких при активации в ходе развития инфекции. Таким образом, уровень экспрессии CD23 зависит и от генетических особенностей, и от уровня активации В-клеток.

Мы установили, что функционально легочные В-клетки служат АПК для Т-лимфоцитов при ТБ, что выражается в активации пролиферации и В-, и Т-лимфоцитов $CD4^+$ *in situ*. Также на поверхности В-клеток легких по мере развития инфекционного процесса повышается уровень экспрессии молекул МНС-II, что соотносится со способностью В-клеток представлять пептиды антигенов микобактерий специфическим Т-лимфоцитам и стимулировать их к пролиферации *in vitro*.

Оценка продукции цитокинов легочными В-клетками при ТБ выявила массивную секрецию ими про-воспалительных цитокинов IL-6 и IL-11, небольшую продукцию TNF- α , но не IFN- γ и IL-10. Исследование в модели ТБ на мышах В-IL-6КО с избирательным выключением гена *Il6* в В-клетках показало, что такие мыши более чувствительны к ТБ. Этот фенотип был промежуточным по отношению к мышам с полным отсутствием продукции IL-6 (IL-6КО) и линией дикого типа В6. Мы показали, что В-лимфоциты являются одним из основных источников продукции IL-6 в легких на ранних сроках после инфицирования. В условиях дефицита IL-6 в В-клетках снижалось количество специфических Т-лимфоцитов $CD4^+$, продуцирующих IFN- γ и IL-17, в ответ на стимуляцию антигенами микобактерий. Кроме того, в отсутствие В-клеточного IL-6 была нарушена дифференцировка фолликулярных TfhCXCR5⁺ в легких и селезенке, что было ассоциировано с пониженной экспрессией гена для цитокина IL-21. При этом избирательное выключение в В-лимфоцитах гена для TNF показало, что продуцируемый В-лимфоцитами TNF необходим для формирования В-фолликулов в легких, но не критичен для развития защитного ответа на *M. tuberculosis* и *M. avium*.

Исследование секреции антител (АТ) легочными В-лимфоцитами показало, что они производят АТ классов IgM, IgG, IgA, но не IgE. Интересно, что большая часть АТ, продуцируемых легочными В-лимфоцитами зараженных ТБ мышей чувствительной к ТБ линии I/St, не имели специфичности ни к антигенам микобактерий, ни к собственным антигенам. По анализу репертуаров BCR мы показали, что в легочные В-клетки мышей I/St после заражения ТБ с низкой

частотой генерируют реакции соматических гипер-мутаций и образуют небольшое количество некрупных кластеров с клонами легочных В-клеток, преимущественно клонотипов IgM и IgG. Напротив, легочные В-клетки резистентных мышей В6 образовывали крупные, специфичные к антигенам микобактерий кластеры преимущественно клонотипа IgA. Более низкий уровень соматического гипер-мутагенеза в совокупности с более высоким уровнем специфичных к микобактериям АТ IgM в сыворотке крови чувствительных животных могут свидетельствовать о замедленном ответе В-клеток на инфекцию. Ответ мышей резистентной линии свидетельствует о более активной специфической подстройке иммуноглобулинов этих животных к антигенам микобактерий.

Мы выявили различия в характере образования В-фолликулов в легких мышей с оппозитной чувствительностью к заражению различными по вирулентности микобактериями. При заражении слабовирулентными *M. avium*, большее количество В-фолликулов в легких ассоциировано с чувствительным фенотипом. При заражении высоковирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv у животных чувствительной линии I/St по мере развития ТБ В-клетки постепенно уходят, и В-фолликулы рассасываются, что сопровождается диссеминированным воспалением и образованием некротических очагов. В то же время, у более резистентных мышей В6 В-фолликулы сохраняются длительное время и в хронической стадии заболевания. Длительное сохранение В-фолликулов ассоциировано со сдерживанием воспаления и достоверно меньшей экспрессией генов для воспалительных цитокинов IL-1a, IL-6, IL-11, IL-17 и TNF- α , по сравнению с мышами чувствительной линии I/St.

Мы показали, что удаление В-клеток в хронической стадии ТБ приводит к повышению чувствительности к инфекции, что соответствует защитной роли В-клеток и легочных В-фолликулов. Удаление В-лимфоцитов не повлияло на установившийся ответ Т-лимфоцитов CD4⁺, но привело к увеличению экспрессии в легочной ткани генов факторов, ассоциированных с нейтрофильным воспалением: аттрактантов нейтрофилов CXCL1 и IL-17, металлопротеиназ MMP8 и MMP9, участвующих в повреждении ткани при воспалении, а также

воспалительного фактора нейтрофилов S100A8. Такой сдвиг в сторону активации ответа нейтрофилов после удаления В-лимфоцитов *in vivo* вполне соответствует представлению о сдерживающей роли В-клеток и В-фолликулов в развитии туберкулезного воспаления.

В заключение отметим, что традиционно считающиеся второстепенными факторами иммунитета при противотуберкулезном ответе В-лимфоциты и нейтрофилы, на самом деле вносят большой вклад в иммунный ответ на микобактерии. В модели вакцинации BCG и заражения ТБ нами получены свидетельства патогенной роли нейтрофилов. Очень вероятно, что быстрая миграция к первичным очагам инфекции и фагоцитоз микобактерий приводит к тому, что нейтрофилы, плохо убивающие микобактерии, экранируют их от макрофагов, способных эффективно элиминировать патоген, а затем активировать адаптивный иммунный ответ. Помимо этого, в хронической стадии развития инфекции нейтрофилы сами провоцируют излишнее воспаление и способствуют деструкции окружающей ткани легкого. Таким образом, вполне вероятно, что нейтрофилы играют роль «Троянского коня» в иммунном ответе на микобактерии. В связи с этим применяемую для лечения других заболеваний направленную на нейтрофилы препараты вероятно стоит рассматривать для перепрофилирования и разработки новых типов вспомогательной терапии для ТБ.

Одними из клеток, участвующих в торможении миграции нейтрофилов, являются В-лимфоциты. Длительное сохранение в легочной ткани резистентных животных В-фолликулов, включающих специфические к антигенам микобактерий В-лимфоциты, сопровождается меньшим уровнем диффузного воспаления (туберкулезной пневмонии) и образования некротических очагов. Таким образом, персистенцию В-фолликулов в легком можно рассматривать как индикатор более эффективного иммунного ответа при ТБ.

7. Выводы

1. Установлено, что удаление нейтрофилов в первые дни после заражения вирулентными микобактериями *M. tuberculosis* приводит к увеличению числа IFN- γ -продуцирующих клеток в селезенке, уменьшению нейтрофильного воспаления и степени поражения легочной ткани, снижению бактериальной нагрузки и увеличению продолжительности жизни чувствительных к ТБ мышей I/St, но не устойчивых мышей В6. Это свидетельствует о патогенной роли нейтрофилов при ТБ у чувствительных животных.

2. Линия мышей В100, несущая β -цепь класса II комплекса H2 от родительской линии I/St, проявляет большую резистентность к инфекции, вызванной *M. avium*, чем конгенная линия В139, что является зеркальным фенотипом по отношению к заражению ТБ. Показано, что усиленный приток нейтрофилов у мышей В100 ассоциирован с экспрессией генов хемоаттрактантов *Cxcl1*, *Cxcl2* и *Il17*, но не ассоциирован с чувствительностью. Эти данные свидетельствуют о менее выраженном патогенном эффекте ранней миграции нейтрофилов при заражении менее вирулентными микобактериями.

3. При специфическом и неспецифическом воспалении нейтрофилы секретируют в больших количествах свободный тимидин, что может негативно сказываться на репликации ДНК соседствующих клеток. Полученные данные также должны учитываться при постановке пролиферативных тестов *in vitro* с участием нейтрофилов и исключить метод оценки пролиферации клеток по включению радиоактивно-меченного [^3H]-тимидина.

4. При заражении *M. tuberculosis* В-лимфоциты мигрируют в легкие и размножаются *in situ*, поддерживая образующиеся В-фолликулы. По мере прогрессирования инфекции В-фолликулы рассасываются у чувствительных к ТБ мышей, но сохраняются длительное время у резистентных мышей. Стабильность фолликулов сопровождается сниженной экспрессией в легких генов для воспалительных цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-11, IL-17 и TNF- α . При заражении мышей менее вирулентными микобактериями *M. avium* большее

количество В-фолликулов ассоциировано с чувствительным фенотипом, за проявление которого отвечает аллель *s* гена *slc11a1*.

5. Легочные В-лимфоциты при ТБ презентуют МАГ Т-клеткам; секретируют про-воспалительные цитокины IL-6 и IL-11, TNF- α , но не IFN- γ ; продуцируют антитела классов IgA, IgG и IgM, но не IgE, при этом большая часть легочных В-клеток чувствительных к ТБ мышей производят антитела, не обладающие специфичностью к микобактериям. По анализу репертуаров BCR, легочные В-лимфоциты резистентных мышей В6 образуют крупные, специфичные к МАГ кластеры клонотипа IgA, тогда как В-клетки чувствительной линии мышей I/St – меньшие по размерам и количеству кластеры клонотипов IgM и IgG. Это свидетельствует об отставании иммунного ответа у чувствительных к инфекции животных.

6. Дефицит продукции TNF- α В-клетками приводит к уменьшению образования В-фолликулов в легких, но не влияет на чувствительность мышей к *M. tuberculosis* и *M. avium*. В то же время отсутствие продукции В-клетками IL-6 приводит к повышению чувствительности к туберкулезной инфекции, снижению общего уровня IL-6 в легких в первые недели после инфицирования и нарушению Т-клеточного ответа – уменьшения числа специфических Т-лимфоцитов CD4⁺IFN- γ ⁺ и CD4⁺IL-17⁺, а также фолликулярных Т-лимфоцитов TfhCD4⁺CXCR5⁺.

7. Удаление В-лимфоцитов в хронической стадии ТБ у мышей резистентной линии В6 приводит к увеличению числа микобактерий в органах, развитию нейтрофил-ассоциированного воспаления, более выраженной кахексии и сокращению срока жизни. Это свидетельствует о протективной роли В-клеток и легочных В-фолликулов при ТБ.

8. Дефицит В-лимфоцитов у мышей CBA/N-xid, не отвечающих на вакцинацию VCG против ТБ, приводит к более быстрой миграции нейтрофилов в место введения вакцины VCG, показывая способность В-клеток тормозить миграцию нейтрофилов. Восстановление популяции В-клеток или удаление нейтрофилов за сутки до введения VCG мышам CBA/N-xid приводит к достоверному повышению эффективности вакцинации.

8. Список сокращений

АГ – антиген

АМ – альвеолярными макрофагами

АПК – антиген-презентирующие клетки

АТ – антитела

АФК – активные формы кислорода

БАЛ – бронхоальвеолярная жидкость

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДК – дендритная клетка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующие единицы

КПЭ – клетки перитонеального экссудата

ЛУ – лимфоузлы

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

мРНК – матричная РНК

ПП – плевральная полость

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПИД – синдром приобретённого иммунодефицита

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ARG – arginase – аргиназа

BCG – (*Bacillus Calmette–Guérin*) – бактерии, полученные путём аттенуации *Mycobacterium bovis*, а также одноимённая живая вакцина, осуществляемая путём введением бактерий данного штамма

btk – тирозиновая киназа Бруттона

CFP10 – 10-kDa culture filtrate protein – белок культурального фильтрата 10-кДа

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – твердофазный иммуноферментный анализ

ESAT-6 – early secreted antigenic target of 6-kDa – ранний секреторный антиген 6-кДа

ESX-1 – ESAT-6 secretion system-1 – система, секретирующая ESAT-6

FCS – fetal calf serum – эмбриональная телячья сыворотка

IFN – interferon – интерферон

IgA (G, M, D, E) – иммуноглобулины класса А (G, M, D, E)

IL – interleukin – интерлейкин

iNOS – inducible NO synthase – индуцируемая NO синтаза

LAM – lipoarabinomannan – липоарабиноманнан

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости

MMPs – matrix metalloproteinases – матриксные металлопротеиназы

PBS – phosphate buffered saline - фосфатный буфер

pIgR – полимерный рецептор иммуноглобулинов

PPD – tuberculin purified protein derivative – очищенная белковая фракция антигенов

PRR – Pattern recognition receptors – рецепторы паттернов патогенности

qPCR – quantitative polymerase chain reaction – количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) = ПЦР в реальном времени

QTL – quantitative trait loci, локусы количественных признаков

TGF- β – transforming growth factor β – трансформирующий ростовой фактор β

TLRs – toll-like receptors – Toll-подобные рецепторы

TNF- α – tumor necrosis factor α – фактор некроза опухоли α

9. Список литературы

1. Вишнеvский Б.И., Маничева О.А., Яблонский П.К. *Mycobacterium tuberculosis* // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4. - №4. - С. 319-330. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-319-330
2. Воробьева Н.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. 2020. – Т. 75. – № 4. – С. 210–225.
3. Кноринг Б.Е., Давыдова Н.И., Аветисян А.О., Яблонский П.К. Апоптоз лимфоцитов и иммунный ответ у больных лекарственно-устойчивым фиброзно-кавернозным туберкулезом с различной распространенностью деструктивных изменений в легких. // Медицинская иммунология. – 2019 – Т. 21 – В. 6 – С. 1099-1114. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-6-1099-1114>
4. Лушова А. А., Жеремян Э.А., Астахова Е. А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. // Иммунология. – 2019 – 40 – N 6 – С. 63-76. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16009
5. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии. // Иммунология. – 2019 – Т. 40 – N 5. doi: 10.24411/0206-4952-2019-15010
6. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P.J., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. // *Blood*. – 2005. – V. 106. – P. 1843–1850.
7. Abreu M.T., Carneiro H., Rodrigues-Sousa T., Domingos A., Segorbe-Luis A., Rodrigues-Santos P., et al. Alterations in the peripheral blood B cell subpopulations of multidrug-resistant tuberculosis patients. // *Clin Exp Med* – 2014. – V. 14. – P. 423–9. doi:10.1007/s10238-013- 0258-1
8. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the

- differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. // *Nat Immunol* – 2007. – V. 8. – P. 942-949.
9. Alcais A., Fieschi C., Abel L., Casanova J.L. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. // *J Exp Med* – 2005. – V. 202. – P. 1617-21.
 10. Aleman M., de la Barrera S.S., Schierloh P., Yokobori N., Baldini M., Musella R., Abbate E., Sasiain M. Spontaneous or Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. // *Eur J Immunol* – 2007. – V. 37. – P. 1524–1537.
 11. Aleman M., de la Barrera S.S., Schierloh P.L., Alves L., Yokobori N., Baldini M., Abbate E., Sasiain M.C. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. // *J Infect Dis* – 2005. – V. 192. – P. 399–409.
 12. Aleman M., Garcia A., Saab M.A., de la Barrera S.S., Finiasz M., Abbate E., Sasiain M.C. Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. // *Am J Respir Cell Mol Biol* – 2002. – V. 27. – P. 583–592.
 13. Aleman M., Schierloh P., de la Barrera S.S., Musella R.M., Saab M.A., Baldini M., Abbate E., Sasiain M.C. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. // *Infect Immun* – 2004. – V. 72. – P. 5150– 5158.
 14. Ali M.F., Egan A.M., Shaughnessy GF, Anderson DK, Kottom TJ, Dasari H, Van Keulen VP, Aubry MC, Yi ES, Limper AH, Peikert T, Carmona EM. Antifibrotics Modify B-Cell-induced Fibroblast Migration and Activation in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. // *Am J Respir Cell Mol Biol*. –2021 – V. 64 – N 6 – P. 722-733. doi: 10.1165/rcmb.2020-0387OC
 15. Aliahmad P., Kaye J. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. // *J Exp Med* – 2008. – V. 205. – P. 245-56.
 16. Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremond C., Yermeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B., Nedospasov S.A., Quesniaux V.F., and Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis

- factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. // *Sci. Rep.* – 2013. – V. 3. – P. 1–14.
17. Alvarez-Jimenez V.D., Leyva-Paredes K., Garcia-Martinez M., Vazquez-Flores L., Garcia-Paredes V.G., Campillo-Navarro M., Romo-Cruz I., Rosales-Garcia V.H., Castaneda-Casimiro J., Gonzalez-Pozos S., Hernandez J.M., Wong-Baeza C., Garcia-Perez B.E., Ortiz-Navarrete V., Estrada-Parra S., Serafin-Lopez J., Wong-Baeza I., Chacon-Salinas R., Estrada-Garcia I. Extracellular vesicles released from *Mycobacterium tuberculosis*-infected neutrophils promote macrophage autophagy and decrease intracellular mycobacterial survival. *Front Immunol* – 2018. – V. 9. – P. 272.
 18. Amulic B., Cazalet C., Hayes G.L., Metzler K.D., Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. // *Annu Rev Immunol.* – 2012. – V. 30. – P. 459-89.
 19. Apt A., Kramnik I. Man and mouse TB: contradictions and solutions. // *Tuberculosis (Edinb).* – 2009. – V. 89(3). – P. 195-8. doi: 10.1016/j.tube.2009.02.002.
 20. Apt A.S., Logunova N.N., Kondratieva T.K. Host genetics in susceptibility to and severity of mycobacterial diseases. // *Tuberculosis (Edinb).* – 2017. – V. 106. – P. 1-8. doi: 10.1016/j.tube.2017.05.004.
 21. Arkatkar T., Du S.W., Jacobs H.M., Dam E.M., Hou B., Buckner J.H., Rawlings D.J., Jackson S.W. B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. // *J Exp Med.* – 2017. – V. 214(11). – P. 3207-3217. doi: 10.1084/jem.20170580.
 22. Armstrong J.A., Hart P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. // *J Exp Med* – 1975. – V. 142. – P. 1–16.
 23. Atzeni F., Batticciotto A., Masala I.F., Talotta R., Benucci M., Sarzi-Puttini P. Infections and biological therapy in patients with rheumatic diseases. // *Isr Med Assoc J* – 2016. – V. 18(3-4). – P. 164-7.

24. Azad A.K., Sadee W., Schlesinger L.S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. // *Infect Immun* – 2012. – V. 80. – P. 3343-59.
25. Baghdadi J.E., Orlova M.O., Alter A., Ranque B., Chentoufi M, Lazrak F., Archane M.I., Casanova J.L., Benslimane A., Schurr E., Abel L., An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults. // *J Exp Med* – 2006. – V. 203. – P.1679-84.
26. Bals R., Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. // *Respir Res.* – 2000. – V. 1. – P. 141–50.
27. Balu S., Reljic R., Lewis M.J., Pleass R.J., McIntosh R., Kooten C., van Egmond M., Challacombe S., Woof J.M., Ivanyi J., A Novel Human IgA Monoclonal Antibody Protects against Tuberculosis. // *J Immunol* – 2011. V. 186. – P. 3113–3119. doi:10.4049/jimmunol.1003189.A.
28. Barcelos W., Martins-Filho O.A., Guimarães T.M.P.D., Oliveira M.H.P., Spíndola-de-Miranda S., Carvalho B.N., Toledo Vde P., Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. // *Microbiol Immunol* – 2006. – V. 50. – P. 597–605.
29. Basaraba, R. J., Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. // *Tuberculosis (Edinb.)* - 2008. – V. 88. – P. S35–S47.
30. Bazzoni F., Cassatella M.A., Rossi F., Ceska M., Dewald B., Baggiolini M., Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. // *J. Exp. Med.* – 1991. – V. 173. – V. 771–774.
31. Bekker L. G., Moreira A. L., Bergtold A., Freeman S., Ryffel B., and Kaplan G., Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murinemycobacterial infection are dose dependent. // *Infect. Immun.* - 2000. – V. 68. - P. 6954–6961. doi: 10.1128/IAI.68.12.6954-6961.2000
32. Bénard A., Sakwa I., Schierloh P., Colom A., Mercier I., Tailleux L., Jouneau L., Boudinot P., Al-Saati T., Lang R., Rehwinkel J., Loxton A.G., Kaufmann S.H.E., Anton-Leberre V., O'Garra A., Sasiain M.D.C., Gicquel B., Fillatreau S., Neyrolles O., Hudrisier D., B Cells Producing Type I IFN Modulate Macrophage Polarization

- in Tuberculosis. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2018. - V. 197(6). – P. 801-813. doi: 10.1164/rccm.201707-1475OC.
33. Benoit M., Desnues B., Mege J.L., Macrophage polarization in bacterial infections. // *J Immunol.* – 2008. - V. 181(6). – P. 3733-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.
 34. Berry M.P.R., Graham C.M., McNab F.W., Xu Z., Bloch S.A.A., Oni T., Wilkinson K.A., Banchereau R., Skinner J., Wilkinson R.J., Quinn C., Blankenship D., Dhawan R., Cush J.J., Mejias A., Ramilo O., Kon O.M., Pascual V., Banchereau J., Chaussabel D., O'Garra A., An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. // *Nature* – 2010. – V. 466. – P. 973–977. doi: 10.1038/nature09247
 35. Bhattacharya B., Xiao S., Chatterjee S., Urbanowski M., Ordonez A., Ihms E.A., Agrahari G., Lun S., Berland R., Pichugin A., Gao Y., Connor J., Ivanov A.R., Yan B.S., Kobzik L., Koo B.B., Jain S., Bishai W., Kramnik I., The integrated stress response mediates necrosis in murine *Mycobacterium tuberculosis* granulomas. // *J Clin Invest.* – 2021. V. 131(3). – P. e130319. doi: 10.1172/JCI130319.
 36. Blomgran R., Desvignes L., Briken V., Ernst J.D. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. // *Cell Host Microbe* – 2012. – V. 11. – P. 81–90.
 37. Blomgranand R., Ernst J.D., Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. // *Journal of Immunology.* – 2011. – V. 186.P. 7110–7119.
 38. Bober L.A., Grace M.J., Pugliese-Sivo C., Rojas-Triana A., Waters T., Sullivan L.M., Narula S.K., The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function. // *Immunopharmacology* – 1995. – V. 29. – P. 111–19. doi: 10.1016/0162-3109(94)00050-P
 39. Bogsan C.S.B., Novaes e Brito R.R., Palos M.D.C., Mortara R.A., Almeida S.R., Lopes J.D., Mariano M., B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. // *Int J Exp Pathol* – 2005. – V. 86. - P. 257–265. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00433.x.

40. Bolotin D. A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Chudakov D.M., MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. // *Nat. Methods* – 2015 – V. 12 – P. 380–381.
41. Bothamley G., Udani P., Rudd R., Festenstein F., Ivanyi J., Humoral response to defined epitopes of tubercle bacilli in adult pulmonary and child tuberculosis. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* -1988. – V. 7. – P. 639–645.
42. Bourigault M.L., Segueni N., Rose S., Court N., Vacher R., Vasseur V., Erard F., Le Bert M., Garcia I., Iwakura Y., Jacobs M., Ryffel B., Quesniaux V.F., Relative contribution of IL-1alpha, IL-1beta and TNF to the host response to *Mycobacterium tuberculosis* and attenuated *M. bovis* BCG. // *Immun Inflamm Dis* – 2013. – V. 1. – P. 47-62.
43. Braian C., Hoge V., Stendahl O. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Neutrophil Extracellular Traps Activate Human Macrophages. // *J. Innate Immun.* – 2013. – V. 5. – P. 591–602.
44. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. // *Science* – 2004. – V. 303. – P. 1532–1535.
45. Cambier C.J., Takaki K.K., Larson R.P., Hernandez R.E., Tobin D.M., Urdahl K.B. Cosma C.L., Ramakrishnan L., *Mycobacteria* manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. // *Nature* – 2013. – V. 505. – P. 218–222.
46. Canonne-Hergaux F., Gruenheid S., Govoni G., Gros P., The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. // *Proc Assoc Am Physicians.* – 1999. – V. 111(4). – P. 283-289. doi: 10.1046/j.1525-1381.1999.99236.x.
47. Carpenter S.M., Lu L.L. Leveraging Antibody, B Cell and Fc Receptor Interactions to Understand Heterogeneous Immune Responses in Tuberculosis. // *Front Immunol.* – 2022. – V. 13. – P. 830482. doi: 10.3389/fimmu.2022.830482.
48. Carter N.A., Vasconcellos R., Rosser E.C., Tulone C., Muñoz-Suano A., Kamanaka M., Ehrenstein M.R., Flavell R.A., Mauri C., Mice lacking endogenous IL-10-

- producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. // *J Immunol* – 2011. – V. 186. – P. 5569–79. doi:10.4049/jimmunol.1100284.
49. Casadevall A., Pirofski L., A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. // *Adv Immunol* – 2006. – V. 91. – P. 1–44. doi:10.1016/S0065-2776(06)91001-3.
 50. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, Aravena O. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. // *Front Immunol.* – 2021 – V. 12 – P. 611795. doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
 51. Cavalcante-Silva, L.H.A., Almeida, F.S., Andrade, A.G.d., Comberlang, F.C.; Cardoso, L.L., Vanderley, S.E.R.; Keesen, T.S.L. Mycobacterium tuberculosis in a Trap: The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Tuberculosis. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24 – P. 11385. <https://doi.org/10.3390/ijms241411385>.
 52. Castillo E.F., Dekonenko A., Arko-Mensah J., Mandell M.A., Dupont N., Jiang S., Delgado-Vargas M., Timmins G.S., Bhattacharya D., Yang H., Hutt J., Lyons C.R., Dobos K.M., Deretic V., Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2012. – V. 109. – P. 3168–76. doi: 10.1073/pnas.1210500109
 53. Chan E.D., Chan J., Schluger N.W., What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* - 2001. – V. 25(5). – P. 606-12.
 54. Chan J., Mehta S., Bharrhan S., Chen Y., Achkar J.M., Casadevall A., Flynn J., The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. // *Semin Immunol* – 2014. – V. 26. – P. 588-600.
 55. Chen B.C., Chou C.F., Lin W.W., Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric- oxide synthase induction in J774 macrophages: Role of intracellular calcium. // *J Biol Chem* - 1998. – V. 273(45). – P. 29754-63. doi:10.1074/jbc.273.45.29754.

56. Chen C., Xu H., Peng Y., Luo H., Huang G.X., Wu X.J., Dai Y.C., Luo H.L., Zhang J.A., Zheng B.Y., Zhang X.N., Chen Z.W., Xu J.F., Elevation in the counts of IL-35-producing B cells infiltrating into lung tissue in mycobacterial infection is associated with the downregulation of Th1/Th17 and upregulation of Foxp3(+)Treg. // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10(1). – P. 13212. doi: 10.1038/s41598-020-69984-y.
57. Chen X., Jensen P.E., The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* – 2008. – V. 56(2). – P. 77-83. doi: 10.1007/s00005-008-0014-5.
58. Choi H., Chon H. R., Kim K., Oh K.J., Jeong S.H., Jung W.J., Shin B., Jhun B.W., Lee H., Park H.Y., Koh W.J. Clinical and laboratory differences between lymphocyte- and neutrophil- predominant pleural tuberculosis. // *PloS One* – 2016. – V. 11. – 10. - P. e0165428.
59. Choreño-Parra J.A., Bobba S., Rangel-Moreno J., Ahmed M., Mehra S., Rosa B., Martin J., Mitreva M., Kaushal D., Zúñiga J., Khader S.A. Mycobacterium tuberculosis HN878 infection induces human-like B cell follicles in mice. // *J Infect Dis.* – 2020. – V. 221(10). – P. 1636-1646. pii: jiz663. doi: 10.1093/infdis/jiz663.
60. Cohen S.B., Gern B.H., Delahaye J.L., Adams K.N., Plumlee C.R., Winkler J.K., Sherman D.R., Gerner M.Y., Urdahl K.B., Alveolar macrophages provide an early mycobacterium tuberculosis niche and initiate dissemination. // *Cell Host Microbe.* – 2018. – V. 24(3). – P. 439-446. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.001.
61. Condliffe A.M., Chilvers E.R., Haslett C., Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. // *Immunology* – 1996. – V. 89. – P. 105–111.
62. Cooper A.M., Dalton D.K., Stewart T.A., Griffin J.P., Russell D.G., Orme I.M., Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. // *J Exp Med.* – 1993. – V. 178(6). – P. 2243-7. doi: 10.1084/jem.178.6.2243.
63. Cooper A.M., Magram J., Ferrante J., Orme I.M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with

- mycobacterium tuberculosis. // *J Exp Med.* – 1997. – V. 186(1). – P. 39-45. doi: 10.1084/jem.186.1.39.
64. Corleis B. F., Korbel D. F., Wilson R. F., Bylund J. F., Chee R. F., and Schaible U. E., Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils. // *Cell. Microbiol.* – 2012. – V. 14. – P. 1109–1121.
65. Corominas M., Cardona V., Gonzalez L., Caylà J.A., Rufi G., Mestre M., Buendia E., B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in Mycobacterium tuberculosis infection. // *Int J Tuberc Lung Dis* – 2004. – V. 8. – P. 98–105.
66. Costello A.M., Kumar A., Narayan V., Akbar M.S., Ahmed S., Abou-Zeid C, Rook G.A., Stanford J., Moreno C., Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis? // *Trans R Soc Trop Med Hyg* – 1992. – V. 86. – P. 686–92.
67. Cruz A.T., Starke J.R. Clinical manifestations of tuberculosis in children. // *Paediatr Respir Rev* – 2007. – V. 8. – P. 107–17. doi:10.1016/j.prrv.2007.04.008.
68. D’Avila H., Roque N.R., Cardoso R.M., Castro-Faria-Neto H.C., Melo R.C.N., Bozza P.T., Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E2 production by macrophages. // *Cell Microbiol* – 2008. – V. 10. – P. 2589– 604.
69. Dai Y.C., Wang W.D., Zhang J.A., Chen C., Luo H.L., Xu H., Peng Y., Luo H., Yang X.R., Chen X., Wu X.J., Chen G.H., Chen Z.W., Xu J.F., MTB driven B cells producing IL-35 and secreting high level of IL-10 in the patients with active pulmonary tuberculosis. // *Mol Immunol.* – 2019. – V. 112. – P. 175-181. doi: 10.1016/j.molimm.2019.05.004.
70. Dallenga T., Repnik U., Corleis B., Eich J., Reimer R., Griffiths G.W., Schaible U.E., M. tuberculosis-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. // *Cell Host Microbe.* – 2017. - V. 22. – P. 519–530.e3. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.003
71. Dallenga T., Schaible U.E., Neutrophils in tuberculosis—first line of defense or booster of disease and targets for host-directed therapy? // *Pathog Dis.* – 2016. – V. 74. – P. 012. doi: 10.1093/femspd/ftw012

72. Dapino P., Dallegri F., Ottonello L., Sacchetti C., Induction of neutrophil respiratory burst by tumour necrosis factor-alpha; priming effect of solid-phase fibronectin and intervention of CD11b-CD18 integrins. // *Clin Exp Immunol.* – 1993. – V. 94. – P. 533–538.
73. Das R., Koo M.-S., Kim B. H. Jacob ST, Subbian S., Yao J., Leng L., Levy R., Murchison C., Burman W.J., Moore C.C., Scheld W.M., David J.R., Kaplan G., MacMicking J.D., Bucala R., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a critical mediator of the innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2013. – V. 110. – P. E2997–E3006.
74. Day T.A., Koch M., Nouailles G., Jacobsen M., Kosmiadi G.A., Miekley D., Kuhlmann S., Jörg S., Gamradt P., Mollenkopf H.J., et al. Secondary Lymphoid Organs Are Dispensable for the Development of T-Cell-Mediated Immunity during Tuberculosis. // *Eur. J. Immunol.* – 2010 – V. 40 – P. 1663–1673.
75. De Voss J.J., Rutter K., Schroeder B.G., Barry C.E. 3rd. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. // *J Bacteriol.* – 1999. – V. 181(15). P. 4443-51. doi: 10.1128/JB.181.15.4443-4451.1999.
76. Deffert C., Cachat J., Krause K.-H. Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. // *Cell Microbiol.* – 2014. – V. 16. – P. 1168–78. doi: 10.1111/cmi.12322.
77. DeLeo F.R., Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. // *Apoptosis* – 2004. – V. 9. – P. 399–413.
78. Della-Torre E., Rigamonti E., Perugino C., Baghai-Sain S., Sun N., Kaneko N., Maehara T., Rovati L., Ponzoni M., Milani R., Lanzillotta M., Mahajan V., Mattoo H, Molineris I, Deshpande V, Stone JH, Falconi M, Manfredi AA, Pillai S. B lymphocytes directly contribute to tissue fibrosis in patients with IgG4-related disease. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2020 – V. 145 – N 3 – P. 968-981.e14. doi: 10.1016/j.jaci.2019.07.004

79. Desvignes L. and Ernst J. D., Interferon- γ -responsive non-hematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis. // *Immunity* - 2009. – V. 31. – P. 974–985.
80. Detmers P.A., Lo S.K., Olsen-Egbert E., Walz A., Baggiolini M., Cohn Z.A., Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. // *J Exp Med.* – 1990. – V. 171. – P. 1155–1162.
81. Donald P.R., Marais B.J., Barry C.E., Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. // *Lancet* – 2010. – V. 375. – P. 1852–1854. doi:10.1016/S0140-6736(10)60580-6.
82. Dorhoi A., Desel C., Yermeev V., Pradl L., Brinkmann V., Mollenkopf H.J., Hanke K., Gross O., Ruland J., Kaufmann S.H., The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. // *The Journal of Experimental Medicine* -2010. - V. 207. - P. 777–792.
83. Dorhoi A., Iannaccone M., Farinacci M., Faé K.C., Schreiber J., Moura-Alves P., ouailles G., Mollenkopf H.J., Oberbeck-Müller D., Jörg S., Heinemann E., Hahnke K., Löwe D., Del Nonno F., Goletti D., Capparelli R., Kaufmann S.H., MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. // *J Clin Invest.* – 2013. – V. 123. – P. 4836–48. doi: 10.1172/JCI67604
84. Driver E. R., Ryan G. J., Hoff D. R., Irwin S.M., Basaraba R.J., Kramnik I., Lenaerts A.J., Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation using C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against Mycobacterium tuberculosis. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2012. – V. 56. - P. 3181–3195.
85. du Plessis W.J., Keyser A., Walzl G., Loxton A.G., Phenotypic analysis of peripheral B cell populations during Mycobacterium tuberculosis infection and disease. // *J Inflamm (Lond)* – 2016. – V. 13. – P. 23. doi:10.1186/s12950-016-0133-4.
86. Dubois Cauwelaert N., Baldwin S.L., Orr M.T., Desbien A.L., Gage E., Hofmeyer K.A., Coler R.N. Antigen presentation by B cells guides programming of memory

- CD4⁺ T-cell response to a TLR4-agonist containing vaccine in mice. // *Eur J Immunol* – 2016. – V. 46. – P. 2719–29. doi:10.1002/eji.201646399.
87. Eddens T., Elsegeiny W., Garcia-Hernandez M. de la L., Castillo P., Trevejo-Nunez G., Serody K., Campfield B.T., Khader S.A., Chen K., Rangel-Moreno J., Kolls J.K. Pneumocystis-Driven Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation Requires Th2 and Th17 Immunity. // *Cell Rep* – 2017. – V. 18. – P. 3078–90. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.016.
88. Ehlers S., Benini J., Held H.D., Roeck C., Alber G., Uhlig S. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. // *J Exp Med* – 2001. – V. 194. – P. 1847–59.
89. Ellison M.A., Gearheart C.M., Porter C.C., Ambruso D.R., IFN- γ alters the expression of diverse immunity related genes in a cell culture model designed to represent maturing neutrophils. // *PLoS ONE* – 2017. – V. 12. – P. 1–31. doi: 10.1371/journal.pone.0185956
90. Eruslanov E.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Majorov K.B., Scheglov I.V., Orlova M.O., Apt A.S., Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. // *Infect Immun.* – 2005. - V. 73. – P. 1744–53. doi: 10.1128/IAI.73.3.1744-1753.2005
91. Ethuin F., Gérard B., Benna J.E., Boutten A., Gougereot-Pocidallo M.-A., Jacob L., Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. // *Lab Invest.* – 2004. – V. 84. – P. 1363–1371. doi: 10.1038/labinvest.3700148.
92. Eto D., Lao C., DiToro D., Barnett B., Escobar T.C., Kageyama R., Yusuf I., Crotty S. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T_{fh}) differentiation. // *PLoS One.* – 2011. - V. 6(3). – P. e17739. doi: 10.1371/journal.pone.0017739.
93. Eum S.Y., Kong J.H., Hong M.S., Lee Y.J., Kim J.H., Hwang S.H., Cho S.N., Via L.E., Barry C.E. 3rd. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in

- the airways of patients with active pulmonary TB. // *Chest* – 2010. – V. 137(1). – P. 122–128. doi:10.1378/chest.09-0903
94. Fillatreau S., Novel regulatory functions for Toll-like receptor-activated B cells during intracellular bacterial infection. // *Immunol Rev.* – 2011. – V. 240. – P. 52–71. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00991.x.
 95. Fillatreau S., Sweenie C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M., B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. // *Nat Immunol.* – 2002. – V. 3. – P. 944–950. doi:10.1038/ni833.
 96. Fleige H., Ravens S., Moschovakis G.L., Bolter J., Willenzon S., Sutter G., Häussler S., Kalinke U., Prinz I., Förster R., IL-17- induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. // *J Exp Med* - 2014. – V. 211(4). – P. 643-51. doi:10.1084/jem.20131737.
 97. Flesch, I.E .A., and Kaufman S.H.E ., Activation of tuberlostatic macrophage functions by gamma interferon and tumor necrosis factor. // *Infect. Immun.* – 1990. – V. 58. – P. 2675.
 98. Fletcher H.A., Snowden M.A., Landry B., Rida W., Satti I., Harris S.A., Matsumiya M., Tanner R., O'Shea M.K., Dheenadhayalan V., Bogardus L., Stockdale L., Marsay L., Chomka A., Harrington-Kandt R., Manjaly-Thomas Z.R., Naranbhai V., Stylianou E., Darboe F., Penn-Nicholson A., Nemes E., Hatherill M., Hussey G., Mahomed H., Tameris M., McClain J.B., Evans T.G., Hanekom W.A., Scriba T.J., McShane H., T-cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants. // *Nat Commun* – 2016. – V. 7. – P. 11290. doi:10.1038/ncomms11290.
 99. Flores-Borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M.R., Isenberg D.A., Mauri C. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. // *Sci Transl Med* – 2013. – V. 5. – P. 173ra23. doi:10.1126/scitranslmed.3005407.
 100. Flynn J.L., Goldstein M.M., Chan J., Triebold K.J., Pfeffer K., Lowenstein C.J., Schreiber R., Mak T.W., and Bloom B.R. Tumor necrosis factor- α is required

- in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. // *Immunity* - 1995. – V. 2. – P. 561–572.
101. Forbes J.R., Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. // *Trends Microbiol.* – 2001. – V. 9(8). – P. 397-403. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02098-4.
 102. Forbes J.R., Gros P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. // *Blood.* – 2003. - V. 102(5). – P. 1884-92. doi: 10.1182/blood-2003-02-0425.
 103. Fortin A., Abel L., Casanova J.L., Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. // *Annu Rev Genomics Hum Genet* – 2007. V. 8. – P. 163– 192.
 104. Francis R.J., Butler R.E., Stewart G.R. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation. // *Cell Death Dis.* – 2014. – V. 5. – P. e1474.
 105. Furze R.C., Rankin S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. // *Immunology* – 2008. – V. 125. – P. 281–288.
 106. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. // *Int Immunopharmacol* – 2013. – V. 17. – P. 638–50. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034
 107. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – V. 3. – P. 710–720. doi: 10.1038/nri1180
 108. Garcia-Bengoia M., Meurer M., Stehr M., Elamin A.A., Singh M., Oehlmann W., Mörgelin M., von Köckritz-Blickwede M. *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE proteins enhance the production of reactive oxygen species and formation of neutrophil extracellular traps. // *Front Immunol.* – 2023 – V. 14 – P. 1206529. doi: 10.3389/fimmu.2023.1206529.
 109. Ghosh S., Hoselton S.A., Schoh J.M. Characterization of CD19⁺ CD23⁺ B2 lymphocytes in the allergic airways of BALB/c mice in response to the inhalation of *Aspergillus fumigatus* conidia. // *Open Immunol J* – 2012. – V. 5. – P. 46e54.

110. Gibson-Corley K.N., Bockenstedt M.M., Li H., Boggiatto P.M., Phanse Y., Petersen C.A., Bellaire B.H., Jones D.E., An in vitro model of antibody-enhanced killing of the intracellular parasite *Leishmania amazonensis*. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9(9). – P. e106426. doi: 10.1371/journal.pone.0106426.
111. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
112. Gibson-Corley, Katherine N. et al., A deficiency in the b cell response of c57bl/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of *leishmania amazonensis*. // *International journal for parasitology* - 2010. – V. 40(2). - P. 157–61. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751909004299>
113. Gideon H. P., Phuah J., Junecko B. A., Mattila J. T., Neutrophils express pro- and anti-inflammatory cytokines in granulomas from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cynomolgus macaques. // *Mucosal Immunol.* – 2019. – V. 12. – P. 1370–1381.
114. Gomez G., Adams L. G., Rice-Ficht A., Ficht T. A., Host-*Brucella* Interactions and the *Brucella* Genome as Tools for Subunit Antigen Discovery and Immunization against *Brucellosis*. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* - 2013. – V. 3. – P. 17. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00017>.
115. Gonzalez-juarrero M., Turner O.C., Turner J., Marietta P., Brooks J. V., Orme I., Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis* *nfect Immun.* - 2001. V. 69. – P. 1722–8. doi:10.1128/IAI.69.3.1722.
116. Gopal R., Lin Y., Obermajer N., Slight S., Nuthalapati N., Ahmed M., Kalinski P., Khader S.A., IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. // *European journal of immunology* - 2012. – V. 42. – P. 364–373.
117. Gopal R., Monin L., Torres D., Slight S., Mehra S., McKenna K.C., Fallert Junecko B.A., Reinhart T.A., Kolls J., Báez-Saldaña R., Cruz-Lagunas A., Rodríguez-Reyna T.S., Kumar N.P., Tessier P., Roth J., Selman M., Becerril-Villanueva E., Baquera-Heredia J., Cumming B., Kasprowicz V.O., Steyn A.J., Babu S., Kaushal

- D., Zúñiga J., Vogl T., Rangel-Moreno J., Khader S.A. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2013. – V. 188. – P. 1137–1146. doi: 10.1164/rccm.201304-0803OC
118. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. // *Nat Rev Immunol* – 2005. – V. 5. – P. 953–964. doi:10.1038/nri1733.
119. Grant A.V., El Baghdadi J., Sabri A., El Azbaoui S., Alaoui-Tahiri K., Abderrahmani Rhorfi I., Gharbaoui Y., Abid A., Benkirane M., Raharimanga V., Richard V., Orlova M., Boland A., Migaud M., Okada S., Nolan D.K., Bustamante J., Barreiro L.B., Schurr E., Boisson-Dupuis S., Rasolofo V., Casanova J.L., Abel L. Age-dependent association between pulmonary tuberculosis and common TOX variants in the 8q12–13 linkage region. // *Am J Hum Genet* – 2013. – V. 92. – P. 407-414.
120. Griffin G.K., Newton G., Tarrío M.L., Bu D.X., Maganto-García E., Azcutia V., Alcaide P., Grabie N., Luscinskas F.W., Croce K.J., Lichtman A.H., IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. // *J Immunol.* – 2012. – V. 188(12). – P. 6287-6299. doi: 10.4049/jimmunol.1200385.
121. Guirado E., Amat I., Gil O., Díaz J., Arcos V., Cáceres N., Ausina V., Cardona P.J. Passive serum therapy with polyclonal antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* protects against post- chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. // *Microbes Infect* - 2006B. – V. 8. – P. 1252–1259. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.004.
122. Guirado E., Gordillo S., Gil O., Diaz J., Tapia G., Vilaplana C., Ausina V., Cardona P.J., Intragranulomatous necrosis in pulmonary granulomas is not related to resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection in experimental murine models induced by aerosol. // *Int J Exp Pathol* - 2006A. – V. 87. – P. 139–49.
123. Hahn J., Knopf J., Maueröder C., Kienhöfer D., Leppkes M., Herrmann M. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution

- of inflammation. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2016. – V. 34 – P. 6–8. DOI:10.1371/journal.pone.0115474.
124. Halle S., Dujardin H.C., Bakocevic N., Fleige H., Danzer H., Willenzon S., Suezer Y., Hämmerling G., Garbi N., Sutter G., Worbs T., Förster R. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. // *J Exp Med* – 2009. V. 206. – P. 2593–2601. doi:10.1084/jem.20091472.
125. Hamada H., Hiroi T., Nishiyama Y., Takahashi H., Masunaga Y, Hachimura S., Kaminogawa S., Takahashi-Iwanaga H., Iwanaga T., Kiyono H., Yamamoto H., Ishikawa H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. // *J Immunol* – 2002. - V. 168. – P. 57-64.
126. Hamasur B., Haile M., Pawlowski A., Schroder U., Kallenius G., Svenson S.B., A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab')₂ fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. // *Clin Exp Immunol* – 2004. – V. 138. – P. 30–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02593.x.
127. Hambleton S., Salem S., Bustamante J., Bigley V., Boisson-Dupuis S., Azevedo J., Fortin A., Haniffa M., Ceron-Gutierrez L., Bacon C.M., Menon G., Trouillet C., McDonald D., Carey P., Ginhoux F., Alsina L., Zumwalt T.J., Kong X.F., Kumararatne D., Butler K., Hubeau M., Feinberg J., Al-Muhsen S., Cant A., Abel L., Chaussabel D., Doffinger R., Talesnik E., Grumach A., Duarte A., Abarca K., Moraes-Vasconcelos D., Burk D., Berghuis A., Geissmann F., Collin M., Casanova J.L., Gros P. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. // *N Engl J Med.* – 2011. – V. 365. – P. 127-38.
128. Hardy R.R., Hayakawa K. B cell development pathways. // *Annu Rev Immunol* – 2001. – V. 19.- P. 595–621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595.
129. Hardy R.R., Hayakawa K. CD5+ B cells, a fetal B cell lineage. // *Adv Immunol* – 1994. V. 55. – P. 297–339.

130. Harishankar M., Selvaraj P., Bethunaickan R. Influence of Genetic Polymorphism Towards Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. // *Front Med (Lausanne)*. – 2018. – V. 5. – P. 213. doi: 10.3389/fmed.2018.00213. eCollection 2018.
131. Hata D., Kawakami Y., Inagaki N., Lantz C.S., Kitamura T., Khan W.N., Maeda-Yamamoto M., Miura T., Han W., Hartman S.E., Yao L., Nagai H., Goldfeld A.E., Alt F.W., Galli S.J., Witte O.N., Kawakami T. Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεR1-dependent mast cell degranulation and cytokine production. // *J Exp Med* – 1998. – V. 187. – P. 1235–1247.
132. Hatta M., Ratnawati, Tanaka M., Ito J., Shirakawa T., Kawabata M., NRAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms and host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae* in South Sulawesi, Indonesia. // *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. – 2010. – V. 41(2). – P. 386-394.
133. Helming L., Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. // *Immunobiology* – 2007. – V. 212. – P. 785–93. doi:10.1016/j.imbio.2007.09.012.
134. Hernandez J., Velazquez C., Valenzuela O., Robles-Zepeda R., Ruiz-Bustos E., Navarro M., Garibay-Escobar A. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. // *Immunol Invest* – 2010. – V. 39. – P. 197–205. doi:10.3109/08820130903586346.
135. Hertz D., Dibbern J., Eggers L., von Borstel L., Schneider B.E. Increased male susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with smaller B cell follicles in the lungs. // *Sci Rep*. – 2020. – V. 10(1). – P. 5142. doi: 10.1038/s41598-020-61503-3.
136. Hoffmann E.M., and Houle J.J., Contradictory Roles for Antibody and Complement in the Interaction of *Brucella Abortus* with Its Host. // *Critical reviews in microbiology* - 1995. – V. 21(3). – P. 153–163. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408419509113538>.
137. Höglund M., Håkansson L., Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. // *Eur J Haematol*. – 1997. – V. 58. – P. 195–202.

138. Hunter R.L., Jagannath C., Actor J.K. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs. // *Tuberculosis (Edinb)* – 2007. – V. 87. – P. 267–278.
139. Jacobs M., Marino M.W., Brown N., Abel B., Bekker L.G., Quesniaux V.J., Fick L., Ryffel B. Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF α -deficient mice by bone marrow transplantation. // *Lab. Invest.* – 2000. – V. 80. – P. 901–914.
140. Jamaati H., Mortaz E., Pajouhi Z., Folkerts G., Movassaghi M., Moloudizargari M., Adcock I.M., Garssen J. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. // *Front Microbiol.* – 2017. V. 8. – P. 2008. doi: 10.3389/fmicb.2017.02008.
141. Jena P., Mohanty S., Mohanty T., Kallert S., Morgelin M., Lindstrøm T., Borregaard N., Stenger S., Sonawane A., Sørensen O.E. Azurophil granule proteins constitute the major Mycobactericidal proteins in human neutrophils and enhance the killing of Mycobacteria in macrophages. // *PLoS ONE* – 2012. – V. 7. – P. e50345. doi: 0.1371/journal.pone.0050345
142. Ji D.X., Witt K.C., Kotov D.I., Margolis S.R., Louie A., Chevée V., Chen K.J., Gaidt M.M., Dhaliwal H.S., Lee A.Y., Nishimura S.L., Zamboni D.S., Kramnik I., Portnoy D.A., Darwin K.H., Vance R.E. Role of the transcriptional regulator SP140 in resistance to bacterial infections via repression of type I interferons. // *Elife.* – 2021. – V. 10. – P. e67290. doi: 10.7554/eLife.67290.
143. Jin L., Batra S., Douda D.N., Palaniyar N., Jeyaseelan S. CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. // *J Immunol.* – 2014. – V. 193. – P. 3549-3558.
144. John-Schuster G., Hager K., Conlon T.M., Irmeler M., Beckers J., Eick-elberg O., Yildirim A.O. Cigarette smoke-induced iBALT mediates macrophage activation in a B cell-dependent manner in COPD. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* – 2014. – V. 307. – P. 692–706.
145. Joller N. Weber S.S., Müller A.J., Spörri R., Selchow P., Sander P., Hilbi H., Oxenius A. 2010. Antibodies Protect against Intracellular Bacteria by Fc Receptor-

- Mediated Lysosomal Targeting. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - 2017. – V. 107(47). – P. 20441–20446. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013827107>.
146. Jones C.E., Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-a, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2002. V. 26. – P. 748–753.
147. Jones G.W., Jones S.A. Ectopic lymphoid follicles: Inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. // Immunology – 2015. – V. 147. – P. 141–151. doi:10.1111/imm.12554.
148. Joosten S.A., van Meijgaarden K.E., Del Nonno F., Baiocchi A., Petrone L., Vanini V., Smits H.H., Palmieri F., Goletti D., Ottenhoff T.H. Patients with tuberculosis have a dysfunctional circulating B-Cell compartment, Which Normalizes following Successful Treatment. // PLoS Pathog – 2016. – V. 12. – P. e1005687. doi:10.1371/journal.ppat.1005687.
149. Junqueira-Kipnis A.P., Kipnis A., Henao Tamayo M., Harton M., Gonzalez Juarrero M., Basaraba R.J., Orme I.M. Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA xid mutant mice infected with Mycobacterium tuberculosis. // Immunology – 2005. – V. 115. – P. 246–252. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02136.x.
150. Kahnert A., Höpken U.E., Stein M., Bandermann S., Lipp M., Kaufmann S.H.E. Mycobacterium tuberculosis triggers formation of lymphoid structure in murine lungs. // J Infect Dis – 2007. – V. 195. – P. 46–54. doi:10.1086/508894.
151. Kang H., Remington J.S., Suzuki Y. Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with Toxoplasma Gondii despite Unimpaired Expression of IFN-Gamma, TNF-Alpha, and Inducible Nitric Oxide Synthase. // Journal of immunology – 2000. V. 164(5). – P. 2629–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679102>.
152. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Avdeenko V.G., Guseva A.N., Kondratieva T.K., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interleukin-11 drives early lung inflammation during

- Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible mice. // PLoS One. – 2011. – V. 6(7). – P. 21878. doi: 10.1371/journal.pone.0021878.
153. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM, Barry CE 3rd, Bekker LG. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun.* – 2003. – V. 71(12). – P. 7099-7108. doi: 10.1128/IAI.71.12.7099-7108.2003.
154. Kean J. The pathogenesis of tuberculosis TNF blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. // *Rheumatology (Oxford)* - (2005. – V. 44. – P. 714–720.
155. Keane J., Gershon S., Wise R.P., Mirabile-Levens E., Kasznica J., Schwieterman W.D., Siegel J.N., Braun M.M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent// *Engl. J. Med.* - 2001. – V. 345. – P. 1098–1014.
156. Keller C., Hoffmann R., Lang R., Brandau S., Hermann C., Ehlers S., Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. // *Infection and Immunity.* - 2006. - V. 74. - P. 4295–4309.
157. Khader S.A., Bell G.K., Pearl J.E., Fountain J.J., Rangel-Moreno J., Cilley G.E., Shen F., Eaton S.M., Gaffen S.L., Swain S.L., Locksley R.M., Haynes L., Randall T.D., Cooper A.M. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. // *Nat Immunol.* – 2007. – V. 8(4). – P. 369-77. doi: 10.1038/ni1449.
158. Khader S.A., Guglani L., Rangel-Moreno J., Gopal R., Beth A., Junecko F., Fountain J.J., Martino C., Pearl J.E., Tighe M., Lin Y.Y., Slight S., Kolls J.K., Reinhart T.A., Randall T.D., Cooper A.M. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. // *J Immunol.* – 2011. – V. 187. – P. 5402–5407. doi:10.4049/jimmunol.1101377.
159. Khan W.N., Alt F.W., Gerstein R.M., Malynn B.A., Larsson I., Rathbun G., Davidson L., Müller S., Kantor A.B., Herzenberg L.A., Rosen F.S., Sideras P.,

- Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. // *Immunity*. – 1995. – V. 3. – P. 283–299.
160. Kimmey J.M., Huynh J.P., Weiss L.A., Park S., Kambal A., Debnath J., Virgin H.W., Stallings C.L. Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during *M. tuberculosis* infection. // *Nature* – 2015. – V. 528. – P. 565–569. doi: 10.1038/nature16451
161. Kisich K.O., Higgins M., Diamond G., Heifets L. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by Human Neutrophils. // *Infect Immun.* – 2002. – V. 70. – P. 4591–4599. doi: 10.1128/IAI.70.8.4591-4599.2002
162. Knaul J.K., Jörg S., Oberbeck-Mueller D., Heinemann E., Scheuermann L., Brinkmann V., Mollenkopf H.J., Yeremeev V., Kaufmann S.H., Dorhoi A. Lung-residing myeloid-derived suppressors display dual functionality in murine pulmonary tuberculosis. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2014. – V. 190. – P. 1053–1066.
163. Kobayashi S.D., DeLeo F.R. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: A systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip. // Rev. Syst. Biol. Med.* – 2009. – V. 1. P. 309–317.
164. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Braughton K.R., DeLeo F.R., Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. // *J. Immunol.* – 2003. – V. 170. – P. 3357–3368.
165. Kocks J.R., Adler H., Danzer H., Hoffmann K., Jonigk D., Lehmann U., Förster R. Chemokine receptor CCR7 contributes to a rapid and efficient clearance of lytic murine gamma-herpes virus 68 from the lung, whereas bronchus-associated lymphoid tissue harbors virus during latency. // *J Immunol* – 2009. – V. 182. – P. 6861–6869. doi:10.4049/jimmunol.0801826.
166. Kondratieva E., Logunova N., Majorov K., Averbakh M., Apt A.S. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to *M. tuberculosis* and *M. avium*. // *PLoS One* – 2010. – V. 5. – P. 10515.

167. Kondratieva E.V., Evstifeev V.V., Kondratieva T.K., Petrovskaya S.N., Pichugin A.V., Rubakova E.I., Averbakh M.M. Jr, Apt A.S. I/St mice hypersusceptible to Mycobacterium tuberculosis are resistant to M. avium. // Infect Immun. – 2007. – V. 75. – P. 4762–4768.
168. Kondratieva T.K., Linge I.A., Kondratieva E.V., Dyatlov A.V., Drutskaya M.S., Zvartsev R.V., Nedospasov SA, Apt AS. Formation of compact aggregates of B-lymphocytes in lung tissue during mycobacterial infection in mice depends on TNF production by these cells and is not an element of the host's immunological protection. // Biochemistry – 2014. – V. 79(12). – P. 1358-1362. doi:10.1134/S0006297914120098.
169. Kondratieva T.K., Rubakova E.I., Linge I.A., Evstifeev V.V., Majorov K.B., Apt A.S. B cells delay neutrophil migration toward the site of stimulus: tardiness critical for effective bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis infection in mice. // J Immunol – 2010. – V. 184. – P. 1227–1234. doi:10.4049/jimmunol.0902011
170. Kotov D.I., Lee O.V., Fattinger S.A., Langner C.A., Guillen J.V., Peters J.M., Moon A., Burd E.M., Witt K.C., Stetson D.B., Jaye D.L., Bryson B.D., Vance R.E. Early cellular mechanisms of type I interferon-driven susceptibility to tuberculosis. // Cell. – 2023 – V. 186 – N 25 – P. 5536-5553e22. doi: 10.1016/j.cell.2023.11.002
171. Kozakiewicz L., Chen Y., Xu J., Wang Y., Dunussi-Joannopoulos K., Ou Q., Flynn J.L., Porcelli S.A., Jacobs W.R. Jr, Chan J. B cells regulate neutrophilia during Mycobacterium tuberculosis infection and BCG vaccination by modulating the interleukin-17 response. // PLoS Pathog – 2013. V. 9. – P. 1003472. doi:10.1371/journal.ppat.1003472.
172. Kramnik I., Beamer G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. // Semin Immunopathol. – 2016. – V. 38(2). – P. 221-37. doi:10.1007/s00281-015-0538-9.
173. Kramnik I., Dietrich W.F., Demant P., Bloom B.R. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. // Proc Natl Acad Sci USA – 2000. – V. 97. – P. 8560–5.

174. Kroon E.E., Coussens A.K., Kinnear C., Orlova M., Möller M., Seeger A., Wilkinson R.J., Hoal E.G., Schurr E. Neutrophils: Innate Effectors of TB Resistance? // *Front Immunol.* – 2018. – V. 14. – P. 2637. doi: 10.3389/fimmu.2018.02637.
175. Kunnath-Velayudhan S., Davidow A.L., Wang H.-Y., Molina D.M., Huynh V.T., Salamon H., Pine R., Michel G., Perkins M.D., Xiaowu L., Felgner P.L., Flynn J.L., Catanzaro A., Gennaro M.L. Proteome-scale antibody responses and outcome of *Mycobacterium tuberculosis* infection in nonhuman primates and in tuberculosis patients. // *J Infect Dis* – 2012. – V. 206. – P. 697– 705. doi:10.1093/infdis/jis421.
176. Kunnath-Velayudhan S., Salamon H., Wang H.-Y., Davidow A.L., Molina D.M., Huynh V.T., Cirillo D.M., Michel G., Talbot E.A., Perkins M.D., Felgner P.L., Liang X., Gennaro M.L. Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. // *Proc Natl Acad Sci* – 2010. – V. 107. – P. 14703–8. doi:10.1073/pnas.1009080107.
177. La Manna M.P., Shekarkar-Azgomi M., Badami G.D., Tamburini B., Dieli C., Di Carlo P., Fasciana T., Marcianò V., Lo Sasso B., Giglio R.V., Giammanco A., Ciaccio M., Dieli F., Caccamo N. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* Infection on Human B Cell Compartment and Antibody Responses. // *Cells.* – 2022. – V. 11(18). – P. 2906. doi: 10.3390/cells11182906.
178. Ladel C.H., Blum C., Dreher A., Reifenberg K., Kopf M., Kaufmann S.H.E.. Lethal Tuberculosis in Interleukin-6-Deficient Mutant Mice. // *Infection And Immunity* – 1997 – P. 4843–4849. doi: 10.1128/iai.65.11.4843-4849.1997.
179. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J., Meller S., Chamilos G., Sebasigari R., Ricciari V., et al.. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA–peptide complexes in systemic lupus erythematosus. // *Sci. Transl. Med.* – 2011 – V. 3 – P. 73ra19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001180>.

180. Lavebratt C., Apt A.S., Nikonenko B.V., Schalling M., Schurr E. Severity of tuberculosis in mice is linked to distal chromosome 3 and proximal chromosome 9. // *J Infect Dis* – 1999. – V. 180. – P. 150–155.
181. Law K., Weiden M., Harkin T., Tchou-Wong K., Chi C., Rom W.N. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 1996. – V. 153. – P. 799–804. doi: 10.1164/ajrccm.153.2.8564135
182. Lee J., Cacalano G., Camerato T., Toy K., Moore M. W., Wood W. I. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. // *J. Immunol.* - 1995. – V. 155. – P. 2158-2164.
183. Leistikow R.L., Morton R.A., Bartek I.L., Frimpong I., Wagner K., Voskuil M.I. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. // *J Bacteriol.* – 2010. – V. 192(6). – P. 1662-70. doi: 10.1128/JB.00926-09.
184. Leu J.-S., Chen M.-L., Chang S.-Y., Yu S.L., Lin C.W., Wang H., Lee L.N., Yu C.J., Kramnik I., Yan B.S. SP110b controls host immunity and susceptibility to tuberculosis. // *Am J Respir Crit Care Med* – 2017. – V. 195. – P. 369-82.
185. Li H., Wang X., Wang B., Fu L., Liu G., Lu Y, et al. Latently and uninfected healthcare workers exposed to TB make protective antibodies against Mycobacterium tuberculosis. // *Proc Natl Acad Sci* – 2017. V. 114. – P. 5023–8. doi:10.1073/pnas.1611776114
186. Li Y., Wang W., Yang F., Xu Y., Feng C., Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. // *Cell Commun Signal.* – 2019 – V. 17 – N 1 – P. 147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y
187. Liao T.L., Lin C.H., Chen Y.M., Chang C.L., Chen H.H., Chen D.Y. Different risk of tuberculosis and efficacy of isoniazid prophylaxis in rheumatoid arthritis patients with biologic therapy: A nationwide retrospective cohort study in Taiwan. // *PLoS One* - 2016. – V. 11(4). – P. e0153217. doi:10.1371/journal.pone.0153217.

188. Liles W.C., Ledbetter J.A., Waltersdorff A.W., Klebanoff S.J. Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. // *J Leukoc Biol.* – 1995. – V. 58. – P. 690–7. doi: 10.1002/jlb.58.6.690
189. Lin P.L., Pawar S., Myers A., Pegu A., Fuhrman C., Reinhart T.A., Capuano S.V., Klein E., Flynn J.L. Early events in Mycobacterium tuberculosis infection in cynomolgus macaques. // *Infect Immun.* – 2006. – V. 74(7). – P. 3790-803. doi: 10.1128/IAI.00064-06.
190. Linge I., Dyatlov A.V., Kondratieva E., Avdienko V., Apt A.S., Kondratieva T. B-lymphocytes forming follicle-like structures in the lung tissue of tuberculosis-infected mice: Dynamics, phenotypes and functional activity. // *Tuberculosis* – 2017. – V. 102. – P. 16-23. doi:10.1016/j.tube.2016.11.005.
191. Liu R., Lauridsen H.M., Amezquita R.A., Pierce R.W., Jane-Wit D., Fang C., Pellowe A.S., Kirkiles-Smith N.C., Gonzalez A.L., Pober J.S. IL-17 promotes neutrophil-mediated immunity by activating microvascular pericytes and not endothelium. // *J Immunol.* – 2016. – V. 197(6). – P. 2400-2408. doi: 10.4049/jimmunol.1600138.
192. Logan E., Luabeya A.K.K., Mulenga H., Mrdjen D., Ontong C., Cunningham A.F., Tameris M., McShane H., Scriba T.J., Horsnell W.G.C., Hatherill M. Elevated IgG Responses in Infants Are Associated With Reduced Prevalence of Mycobacterium tuberculosis Infection. // *Front Immunol* – 2018. – V. 9. – P. 1529. doi:10.3389/fimmu.2018.01529.
193. Logunova N., Korotetskaya M., Polshakov V., Apt A. The QTL within the H2 complex involved in the control of tuberculosis infection in mice Is the classical Class II H2-Ab1 gene. // *PLoS Genet* – 2015. – V. 11. – P. e1005672.
194. Lopez A.F., Williamson D.J., Gamble J.R., Begley C.G., Harlan J.M., Klebanoff S.J., Waltersdorff A., Wong G., Clark S.C., Vadas M.A. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. // *J Clin Invest.* – 1986. – V. 78. – P. 1220–1228.

195. Lovewell R.R., Baer C.E., Mishra B.B., Smith C.M., Sassetti C.M. Granulocytes act as a niche for Mycobacterium tuberculosis growth. // *Mucosal Immunol.* – 2020. – V. 14(1). – P. 229-241. doi: 10.1038/s41385-020-0300-z.
196. Lowe D.M., Bandara A.K., Packe G.E., Barker R.D., Wilkinson R.J., Griffiths C.J., Martineau A.R. Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis. // *Eur Respir J.* – 2013. – V. 42. – P. 1752–1757. doi: 10.1183/09031936.00140913
197. Lowe D.M., Demaret J., Bangani N., Nakiwala J.K., Goliath R., Wilkinson K.A., Martineau A.R. Differential effect of viable versus necrotic neutrophils on Mycobacterium tuberculosis growth and cytokine induction in whole blood. // *Front Immunol.* – 2018. – V. 9. P. 903. doi: 10.3389/fimmu.2018.0090
198. Loxton A.G., van Rensburg I.C. FasL regulatory B-cells during Mycobacterium tuberculosis infection and TB disease. // *J Mol Biol.* – 2021. – V. 433(13). – P. 166984. doi: 10.1016/j.jmb.2021.166984.
199. Lu L.L., Chung A.W., Rosebrock T.R., Ghebremichael M., Yu WH, Grace P.S., Schoen M.K., Tafesse F., Martin C., Leung V., Mahan A.E., Sips M., Kumar M.P., Tedesco J., Robinson H., Tkachenko E., Draghi M., Freedberg K.J., Streeck H., Suscovich T.J., Lauffenburger D.A., Restrepo B.I., Day C., Fortune S.M., Alter G. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. // *Cell* – 2016. – V. 167. – P. 433–443.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.08.072.
200. Lu L.L., Das J., Grace P.S., Fortune S.M., Restrepo B.I., Alter G. Antibody Fc Glycosylation Discriminates Between Latent and Active Tuberculosis. // *J Infect Dis.* – 2020. – V. 222(12). – P. 2093-2102. doi: 10.1093/infdis/jiz643.
201. Lu L.L., Smith M.T., Yu K.K.Q., Luedemann C., Suscovich T.J., Grace P.S., Cain A., Yu W.H., McKittrick T.R., Lauffenburger D., Cummings R.D., Mayanja-Kizza H., Hawn T.R., Boom W.H., Stein C.M., Fortune S.M., Seshadri C., Alter G. IFN- γ -independent immune markers of Mycobacterium tuberculosis exposure. // *Nat Med.* – 2019. – P. 25(6). – P. 977-987. doi: 10.1038/s41591-019-0441-3.
202. Lugo-villarino G., Hudrisier D., Benard A., Neyrolles O. Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. // *Front Immunol.* – 2013. – V. 3. – P. 405. doi:10.3389/fimmu.2012.00405

203. Lund F.E., Randall T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. // *Nat Rev Immunol* – 2010. – V. 10. P. 236e47.
204. Lyadova I.V. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? // *Mediators Inflamm.* – 2017. - V. 2017:8619307. doi: 10.1155/2017/8619307.
205. Maartens G., Wilkinson R.J. Tuberculosis. // *Lancet.* – 2007. – V. 370(9604). – P. 2030-2043. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61262-8.
206. Magcwebeba T., Dorhoi A., du Plessis N. The emerging role of myeloid-derived suppressor cells in tuberculosis. // *Front. Immunol.* – 2019. - V. 10. - P. 917.
207. Maglione P.J., Xu J., Casadevall A., Chan J. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. // *J Immunol* – 2008. – V. 180. – P. 3329–3338.
208. Maglione P.J., Xu J., Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. // *J Immunol* – 2007. – V. 178. – P. 7222–34. doi:17513771.
209. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent *M.tuberculosis*: phenotypes expressed in lung and extra-pulmonary macrophages. // *Infect Immun* - 2003. – V. 71. – P. 697–707.
210. Malik Z.A., Denning G.M., Kusner D.J. Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. // *J Exp Med* – 2000. – V. 191. – P. 287–302.
211. Mangla M., Khare A., Vineeth V., Panday N.N., Mukhopadhyay A., Ravindran B., Bal V., George A., Rath S. Pleiotropic consequences of Bruton’s tyrosine kinase deficiency in myeloid lineages lead to poor inflammatory responses. // *Blood* – 2004. – V. 104. – P. 1191–1197.
212. Marquis J.F., LaCourse R., Ryan L., North R.J., Gros P. Disseminated and rapidly fatal tuberculosis in mice bearing a defective allele at IFN regulatory factor 8. // *J Immunol.* – 2009. – V. 182. – P. 3008-3015.

213. Martineau A.R., Newton S.M., Wilkinson K.A., Kampmann B., Hall B.M., Nawroly N., Packe G.E., Davidson R.N., Griffiths C.J., Wilkinson R.J. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. // *J Clin Invest.* – 2007. – V. 117. – P. 1988–94. doi: 10.1172/JCI31097
214. Martinez A.N., Mehra S., Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. // *J Infect Dis* – 2013. – V. 207. – P. 1253e61.
215. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. // *Annu Rev Immunol.* – 2009. – V. 27. – P. 451-483. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
216. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. // *Front Biosci* – 2008. – V. 13. – P. 453–61.
217. Marzo E., Vilaplana C., Tapia G., Diaz J., Garcia V., Cardona P.-J. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. // *Tuberculosis (Edinb)* – 2014. – V. 94. – P. 55–64. doi: 10.1016/j.tube.2013.09.004
218. Masure S., Proost P., Van Damme J., Opdenakker G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. // *Eur. J. Biochem.* - 1991. – V. 198. – P. 391–398. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16027.x
219. Mauri C., Gray D., Mushtaq N., Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. // *J Exp Med* – 2003. – V. 197. – P. 489–501.
220. Mayadas T. N., Cullere X., Lowell C. A. The multifaceted functions of neutrophils. // *Annu rev Pathol Mech dis.* – 2014. – V. 9. – P. 181–218.
221. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Barber D.L., Hieny S., Feng C.G., Caspar P., Oland S., Gordon S., Sher A. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. // *Immunity.* – 2011. – V. 35(6). – P. 1023-1034.
222. McCracken J.M., Allen L.A. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. // *J. Cell Death* – 2014. – V. 7. – P. 15–23.

223. McDonald K.G., McDonough J.S., Newberry R.D. Adaptive immune responses are dispensable for isolated lymphoid follicle formation: antigen-naive, lymphotoxin-sufficient B lymphocytes drive the formation of mature isolated lymphoid follicles. // *J Immunol* – 2005. – V. 174. – P. 5720e8.
224. Medina E., North R.J Evidence inconsistent with a role for the Bcg gene (Nramp1) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. // *J Exp Med.* – 1996. – V. 183(3). – P. 1045-51.
225. Meilang Q., Zhang Y., Zhang J., Zhao Y., Tian C., Huang J., Fan H. Polymorphisms in the SLC11A1 gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update. // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2012. – V. 16(4). – P. 437-46. doi: 10.5588/ijtld.10.0743. PMID: 22326178 Review.
226. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte- macrophage colony-stimulating factors. // *Blood* – 1986. – V. 67. – P. 257–67.
227. Miralda I., Uriarte S.M., McLeish K.R. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – V. 7. – P. 217. doi: 10.3389/fcimb.2017.00217
228. Mitra S., Abraham E. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. // *Biochim et Biophys Acta* – 2006. – V. 1762. – P. 732–41. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.06.011
229. Mitsos L.M., Cardon L.R., Fortin A., Ryan L., LaCourse R., North R.J., Gros P. Genetic control of susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice. // *Genes Immun* – 2000. – V. 1. – P. 467-477.
230. Mitsos L.M., Cardon L.R., Ryan L., LaCourse R., North R.J., Gros P. Susceptibility to tuberculosis: a locus on mouse chromosome 19 (Tlr-4) regulates *Mycobacterium tuberculosis* replication in the lungs. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2003. – V. 100. – P. 6610-6615.
231. Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R.S., Bhan A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. // *Immunity* – 2002. – V. 16. – P. 219–30.

232. Moir S., Ho J., Malaspina A., Wang W., DiPoto A.C., O'Shea M.A., Roby G., Kottlilil S., Arthos J., Proschan M.A., Chun T.W., Fauci A.S. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV- infected viremic individuals. // *J Exp Med* - 2008. – V. 205(8). – P. 1797-805. doi:10.1084/jem.20072683.
233. Moreira-Teixeira L., Mayer-Barber K., Sher A., O'Garra A. Type I interferons in tuberculosis: Foe and occasionally friend. // *J Exp Med* – 2018. – V. 215. – P. 1273–1285. doi:10.1084/jem.20180325.
234. Moreira-Teixeira L, Tabone O, Graham CM, Singhanian A, Stavropoulos E, Redford PS, Chakravarty P, Priestnall SL, Suarez-Bonnet A, Herbert E, Mayer-Barber KD, Sher A, Fonseca KL, Sousa J, Cá B, Verma R, Haldar P, Saraiva M, O'Garra A. Mouse transcriptome reveals potential signatures of protection and pathogenesis in human tuberculosis. // *Nat Immunol.* – 2020 – V. 21 – N 4 – P. 464-476. doi: 10.1038/s41590-020-0610-z
235. Moyron-Quiroz J.E., Rangel-Moreno J., Kusser K., Hartson L., Sprague F., Goodrich S., Woodland D.L., Lund F.E., Randall T.D. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. // *Nat Med* – 2004. – V. 10. – P. 927–34. doi:10.1038/nm1091.
236. Mukhopadhyay S., Mohanty M., Mangla M., George A., Bal V., Rath S., Ravindran B. Macrophage effector functions controlled by Bruton's tyrosine kinase are more crucial than the cytokine balance of T cell responses for microfilarial clearance. // *J Immunol* – 2002. – V. 168. – P. 2914–2921.
237. Muller I., Munder M., Kropf P., Hansch G. M. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? // *Trends Immunol* – 2009. – V. 30. – P. 522-530.
238. Munder M., Eichmann K., Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. // *J Immunol.* – 1998. – V. 160(11). – P. 5347-54.

239. Murray P.J., Wynn T.A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. // *J Leukoc Biol* - 2011A. – V. 89. – P. 557–63. doi:10.1189/jlb.0710409.
240. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. // *Nat Rev Immunol* - 2011B. – V. 11. – P. 723–37. doi:10.1038/nri3073.
241. N'Diaye E.N., Darzacq X., Astarie-Dequeker C., Daffé M., Calafat J., Maridonneau-Parini I. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. // *J Immunol*. – 1998. – V. 161. – P. 4983–91.
242. Nagabhushanam V., Solache A., Ting L.M., Escaron C.J., Zhang J.Y., Ernst J.D. Ernst. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium tuberculosis-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN-gamma. // *The Journal of Immunology* – 2003. – V. 171. – P. 4750–4757.
243. Nagarai S., Youn J.I., Gabrilovich D. I. Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells // *J. Immunol.* - 2013. – V. 191. – P. 17-23.
244. Nakamura R.M. Effect of natural resistance gene on the immune response against Mycobacterium avium complex infection. // *Kekkaku*. – 1992. – V. 67(1). – P. 41-46.
245. Nandi B., Behar S.M. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. // *J Exp Med*. – 2011. – V. 208. – P. 2251–62. doi: 10.1084/jem.20110919
246. Narasaraju T., Tang, B.M., Herrmann, M., Muller, S., Chow, V.T.K., Radic, M. Neutrophilia and netopathy as Key Pathologic Drivers of Progressive Lung Impairment in Patients With COVID-19. // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11 – P. 870. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00870>.
247. Nathan C. Points of control in inflammation. // *Nature* – 2002. – V. 420. P. 846–52. doi: 10.1038/nature01320

248. Nathan C., Cunningham-Bussell A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – V. 13(5). – P. 349–61. doi: 10.1038/nri3423.
249. Nathan C.F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. // *J Clin Invest.* – 1987. – V. 80. – P. 1550–60. doi: 10.1172/JCI113241
250. Németh T., Sperandio M., Mócsai A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2020. – V. 19(4). – P. 253–275. doi: 10.1038/s41573-019-0054-z
251. Neufert C., Pai R.K., Noss E.H., Berger M., Boom W.H., Harding C.V. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. // *J Immunol.* – 2001. – V. 167. – P. 1542–1549.
252. Niazi M.K., Dhulekar N., Schmidt D., Major S., Cooper R., Abeijon C., Gatti D.M., Kramnik I., Yener B., Gurcan M., Beamer G. Lung necrosis and neutrophils reflect common pathways of susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in genetically diverse, immunocompetent mice. // *Dis Model Mech* – 2015. – V. 8. – P. 1141–53.
253. Nicola N.A., Metcalf D., Matsumoto M., Johnson G.R. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. // *J Biol Chem.* – 1983. – V. 258. – P. 9017–9023.
254. Nikonenko B.V., Apt A.S., Mezhlumova M.B., Avdienko V.G., Yermeev V.V., Moroz A.M. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. // *Clin Exp Immunol* – 1996. – V. 104. – P. 37–43.
255. Nikonenko B.V., Averbakh M.M. Jr, Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant A/Sn inbred mice. // *Tuber Lung Dis.* – 2000. – V. 80(1). – P. 15–25. doi: 10.1054/tuld.1999.0225.
256. North R.J., Jung Y.J. Immunity to tuberculosis. // *Annu Rev Immunol* – 2004. – V. 22. – P. 599–623.

257. Nouailles G., Dorhoi A., Koch M. Zerrahn J., Weiner J. 3rd, Faé K.C., Arrey F., Kuhlmann S., Bandermann S., Loewe D., Mollenkopf H.J., Vogelzang A., Meyer-Schwesinger C., Mittrücker H.W., McEwen G., Kaufmann S.H. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. - V. 124. - P. 1268–1282
258. Nurieva R.I., Chung Y., Hwang D., Yang X.O., Kang H.S., Ma L., Wang Y.H., Watowich S.S., Jetten A.M., Tian Q., Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. // *Immunity*. – 2008 – V. 29 – N 1 – P. 138-49. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.009
259. O'Garra A., Redford P.S., McNab F.W., Bloom C.I., Wilkinson R.J., Berry M.P. The immune response in tuberculosis. // *Annu Rev Immunol*. – 2013. – V. 31. – P. 475-527. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939.
260. Ong C.W., Elkington P.T., Brilha S., Ugarte-Gil C., Tome-Esteban M.T., Tezera L.B., Pabisiak P.J., Moores R.C., Sathyamoorthy T., Patel V. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. // *PLoS Pathog*. – 2015. – V. 11 – P. e1004917. doi: 10.1371/journal.ppat.1004917.
261. Opitz H.G., Niethammer D., Lemke H., Flad H.D., Huget R. Inhibition of 3H-thymidine incorporation of lymphocytes by a soluble factor from macrophages. // *Cell. Immunol*. - 1975. – V. 16. – P. 379-388.
262. Ordoñez C., Savage H.P., Tarajia M., Rivera R., Weeks-Galindo C., Sambrano D., Riley L., Fernandez P.L., Baumgarth N., Goodridge A. Both B-1a and B-1b cells exposed to *Mycobacterium tuberculosis* lipids differentiate into IgM antibody-secreting cells. // *Immunology* – 2018. – V. 154(4). – P. 613-23. doi:10.1111/imm.12909.
263. Orme I.M., Robinson R.T., Cooper A.M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. // *Nat Immunol* – 2014. – V.16. – P. 57–63. doi:10.1038/ni.3048.

264. Ouyang W., Kolls J.K., Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. // *Immunity* - 2008. – V. 28. – P. 454–467.
265. Owen C.A. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* – 2008. – V. 3. – P. 253–268.
266. Pan H., Yan B.S., Rojas M., Shebzukhov Y.V., Zhou H., Kobzik L., Higgins D.E., Daly M.J., Bloom B.R., Kramnik I. *Ipr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. // *Nature* – 2005. – V. 434. – P. 767–772.
267. Pandey AK, Sassetti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4376–80. doi:10.1073/pnas.0711159105.
268. Papayannopoulos V., Zychlinsky A. NETs: A new strategy for using old weapons. // *Trends Immunol.* – 2009. – V. 30. – P. 513–521.
269. Parker H.A., Forrester L., Kaldor C.D., Dickerhof N., Hampton M.B. Antimicrobial Activity of Neutrophils Against Mycobacteria. // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 782495. doi: 10.3389/fimmu.2021.782495.
270. Peng M., Wang W., Qin L., Liu H., Qin M., Zheng W., Shi J., Xu W., Zhu Y. Association between nonspecific interstitial pneumonia and presence of CD20+ B lymphocytes within pulmonary lymphoid follicles. // *Sci Rep* – 2017. – V. 7. – P. 16912. doi:10.1038/s41598-017-17208-1.
271. Peng Y., Schoenlaub L., Elliott A., Mitchell W.J., Zhang G. Characterization of a lipopolysaccharide-targeted monoclonal antibody and its variable fragments as candidates for prophylaxis against the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii*. // *Infection and immunity* - 2014. – V. 82(11). – P. 4530–41. <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01695-14>.
272. Pethe K., Alonso S., Biet F., Delogu G., Brennan M.J., Locht C., Menozzi F.D. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. // *Nature* – 2001. – V. 412:190–4. doi:10.1038/35084083.

273. Petrofsky M., Bermudez L. E., Neutrophils from Myco- bacterium avium-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response. // *Clinical Immunology*. – 1999. – V. 91. – P. 354–358.
274. Phuah J.Y., Mattila J.T., Lin P.L., Flynn J.L. Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with Mycobacterium tuberculosis. // *Am J Pathol* – 2012. – V. 181. – P. 508–14. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.009.
275. Phuah J.Y., Wong E.A., Gideon H.P., Maiello P., Coleman M.T., Hendricks M.R., Ruden R., Cirrincione L.R., Chan J., Lin P.L., Flynn J.L. The Effects of B cell Depletion on early Mycobacterium tuberculosis infection in Cynomolgus Macaques. // *Infect Immun* – 2016. – V. 84(5). – P. 1301-1311. doi:10.1128/IAI.00083-16.
276. Pichugin A.V., Khaidukov S.V., Moroz A.M., Apt A.S. Capacity of murine T cells to retain long-term responsiveness to mycobacterial antigens is controlled by the H-2 complex. // *Clin Exp Immunol*. – 1998. – V. 111(2). – P. 316-24. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00498.x.
277. Pitzalis C., Jones G.W., Bombardieri M, Jones S.A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. // *Nat Rev* – 2014. – V. 14. – P. 447–62. doi:10.1038/nri3700; 10.1038/nri3700.
278. Polverino F., Seys L.J., Bracke K.R., Owen C.A. B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage. // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2016. – V. 311(4). – P. L687-L695. doi: 10.1152/ajplung.00304.2016.
279. Quek L.S., Bolen J., Watson S.P. A role for Bruton’s tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. // *Curr Biol* – 1998. – V. 8. – P. 1137–1140.
280. Quintana A., Erta M., Ferrer B., Comes G., Giralt M., Hidalgo J. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior. // *Brain Behav Immun*. 2013 Jan;27(1):162-73. doi: 10.1016/j.bbi.2012.10.011.
281. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. // *Tuberculosis (Edinb)* – 2008. – V. 88. – P. 576–85.

282. Ramakrishnan L. The zebrafish guide to tuberculosis immunity and treatment. // Cold Spring Harb Symp Quant Biol – 2013. – V. 78. – P. 179–192.
283. Rawlings D.J., Saffran D.C., Tsukada S., Largaespada D.A., Grimaldi J.C., Cohen L., Mohr R.N., Bazan J.F., Howard M., Copeland N.G., Jenkinsand N.A., Witte O.N. Mutation of unique region of Bruton’s tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. // Science – 1993. – V. 261. – P. 358–361.
284. Reljic R., Clark S.O., Williams A., Falero-Diaz G., Singh M., Challacombe S., Marsh P.D., Ivanyi J. Intranasal IFN-gamma extends passive IgA antibody protection of mice against Mycobacterium tuberculosis lung infection. // Clin Exp Immunol – 2006. – V. 143. – P. 467–73. doi:10.1111/j.1365- 2249.2006.03012.x.
285. Remus N., Alcais A., Abel L. Human genetics of common mycobacterial infections. // Immunol Res – 2003. – V. 28. – P. 109-29.
286. Rennard S.I., Dale D.C., Donohue J.F., Kanniss F., Magnussen H., Sutherland E.R., Watz H., Lu S., Stryszak P., Rosenberg E., Staudinger H. CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 proof-of-concept trial for chronic obstructive pulmonary disease. // Am J Respir Crit Care Med. – 2015 – V. 191(9) – P. 1001-11. doi: 10.1164/rccm.201405-0992OC
287. Riedel D.D., Kaufmann S.H., Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. // Infection and Immunity – 1997. – V. 65. – P. 4620–4623.
288. Rijnink W.F., Ottenhoff T.H.M., Joosten S.A. B-Cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis. // Front Immunol. – 2021. – V. 12. – P. 640168. doi: 10.3389/fimmu.2021.640168.
289. Rivas-Santiago B., Hernandez-Pando R., Carranza C., Juarez E., Contreras J.L., Aguilar-Leon D., Torres M., Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. // Infect Immun. – 2008. – V. 76. – P. 935–41. doi: 10.1128/IAI.01218-07
290. Rook G.A.W., Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. // Ann. Rev. Microbiol. - 1996. – V. 50. – P. 259–284.

291. Rosser E.C., Mauri C. Regulatory B Cells: origin, phenotype, and function. // *Immunity* – 2015. – V. 42. – P. 607–12. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.
292. Roy Chowdhury R., Vallania F., Yang Q., Lopez Angel C.J., Darboe F., Penn-Nicholson A., Rozot V., Nemes E., Malherbe S.T., Ronacher K., Walzl G., Hanekom W., Davis M.M., Winter J., Chen X., Scriba T.J., Khatri P., Chien Y.H. A multi-cohort study of the immune factors associated with *M. tuberculosis* infection outcomes. // *Nature* – 2018. – V. 560. – P. 644–648. doi:10.1038/s41586-018-0439-x.
293. Roy E., Stavropoulos E., Brennan J., Coade S., Grigorieva E., Walker B., Dagg B., Tascon R.E., Lowrie D.B., Colston M.J., Jolles S. Therapeutic Efficacy of High-Dose Intravenous Immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. // *Infect Immun* – 2005. – V. 73. – P. 6101–6109. doi:10.1128/IAI.73.9.6101-6109.2005.
294. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. // *Immunol Rev* – 2011. – V. 241. – P. 260–268. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.
295. Russell D.G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2001. – V. 2. – P. 569–586. doi: 10.1038/35085034
296. Russell D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? // *Nature Rev. Microbiol.* - 2007. - V. 5. – P. 39–47.
297. Russell D.G., Cardona P.-J., Kim M.-J., Allain S., Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. // *Nat Immunol* – 2009. – V. 10. – P. 943–948. doi:10.1038/ni.1781.
298. Ryckman C., McColl S.R., Vandal K., de Medicis R., Lussier A., Poubelle P.E., Tessier P.A. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. // *Arthritis Rheum* – 2003. – V. 48. – P. 2310–2320.
299. Sakai S., Kauffman K.D., Sallin M.A., Sharpe A.H., Young H.A., Ganusov V.V., Barber D.L. CD4 T cell-derived IFN- γ plays a minimal role in control of pulmonary mycobacterium tuberculosis infection and must be actively repressed by PD-1 to

- prevent lethal disease. // *PLoS Pathog.* – 2016. – V. 12(5). – P. e1005667. doi: 10.1371/journal.ppat.1005667.
300. Saunders B.M., Frank A.A., Orme I.M. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* – 1999. – V. 98(3). – P. 324-8. doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00877.x.
301. Saunders B.M., Frank A.A., Orme I.M., Cooper A.M. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to mycobacterium tuberculosis infection. // *Infection and immunity* – 2000. – V. 68(6). – P. 3322–3326.
302. Sawant K. V., McMurray D.N., Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. // *Infection and Immunity.* -2007. - V. 75. – P. 1870–1877.
303. Schierloh P., Landoni V., Balboa L., Musella R.M., Castagnino J., Moraña E, de Casado G.C., Palmero D., Sasiain M.C. Human pleural B-cells regulate IFN- γ production by local T-cells and NK cells in a *Mycobacterium tuberculosis* -induced delayed hypersensitivity reaction. // *Clin Sci* – 2014. – V. 127. – P. 391–403. doi:10.1042/CS20130769.
304. Schneider B. E., Korbel D., Hagens K. Koch M., Raupach B., Enders J, Kaufmann S.H., Mittrücker H.W., Schaible U.E. A role for IL-18 in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. // *European Journal of Immunology.* – 2010. - V. 40. – P. 396–405.
305. Schurr E., Kramnik I. Genetic control of host susceptibility to tuberculosis. In: Kaufmann, S.; Britton, W., editors. *Handbook of Tuberculosis: Immunology and Cell Biology.* Weinheim: WILEY- VCH Verlag; 2008. p. 295-336.
306. Scott N.R., Swanson R.V., Al-Hammadi N., Domingo-Gonzalez R., Rangel-Moreno J., Kriel B.A., Bucsan A.N., Das S., Ahmed M., Mehra S., Treerat P., Cruz-Lagunas A., Jimenez-Alvarez L., Muñoz-Torrico M., Bobadilla-Lozoya K., Vogl T., Walzl G., du Plessis N., Kaushal D., Scriba T., Zuñiga J., Khader S. S100A8/A9

- regulates CD11b expression and neutrophil recruitment during chronic tuberculosis. // *J Clin Invest.* – 2020. – 130(6). – P. 3098-3112. doi: 10.1172/JCI130546.
307. Seiler P., Aichele P., Raupach B., Odermatt B., Steinhoff U., Kaufmann S.H. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. // *J Infect Dis* – 2000. – V. 181. – P. 671–680.
308. Sharma S., Orłowski G., Song W. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. // *J Immunol* – 2009. – V. 182. – P. 329–339.
309. Sharma S., Verma I., Khuller G.K. Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: in vitro and ex vivo study. // *Eur Respir J.* – 2000. – V. 16. – P. 112–117.
310. Sharma S., Verma I., Khuller G.K. Biochemical interaction of human neutrophil peptide-1 with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. // *Arch Microbiol.* – 1999. – V. 171. – P. 338–342.
311. Sharma S., Verma I., Khuller G.K. Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – V. 45. – P. 639–40. doi: 10.1128/AAC.45.2.639-640.2001
312. Shea-Donohue T., Thomas K., Cody M.J., Aiping Zhao, Detolla L.J., Kopydlowski K.M., Fukata M., Lira S.A., Vogel S.N. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. // *Innate Immun.* – 2008. – V. 14. – P. 117-124.
313. Shen P., Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. // *Nat Rev Immunol* – 2015. – V. 15. – P. 441–51. doi:10.1038/nri3857.
314. Shen P., Roch T., Lampropoulou V., O'Connor R.A., Stervbo U., Hilgenberg E., Ries S., Dang V.D., Jaimes Y., Daridon C., Li R., Jouneau L., Boudinot P., Wilantri S., Sakwa I., Miyazaki Y., Leech M.D., McPherson R.C., Wirtz S., Neurath M., Hoehlig K., Meinl E., Grützkau A., Grün J.R., Horn K., Kühl A.A., Dörner T., Bar-Or A., Kaufmann S.H.E., Anderton S.M., Fillatreau S. IL-35- producing B cells are

- critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. // Nature – 2014. – V. 507. – P. 366–70. doi:10.1038/nature12979.
315. Shepelkova G., Evstifeev V., Majorov K., Bocharova I., Apt A. Therapeutic effect of recombinant mutated interleukin 11 in the mouse model of tuberculosis. // J Infect Dis – 2016. – V. 214. – P. 496-501.
316. Silva M. T., When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. // Journal of Leukocyte Biology. - 2010. - V. 87. - P. 93–106.
317. Slight S.R., Rangel-Moreno J., Gopal R., Lin Y., Junecko B. a F., Mehra S., Selman M., Becerril-Villanueva E., Baquera-Heredia J., Pavon L., Kaushal D., Reinhart T.A., Randall T.D., Khader S.A. CXCR5 + T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. // J Clin Invest – 2013. – V. 123. – P. 1– 15. doi:10.1172/JCI65728DS1.
318. Soehnlein O., Kai-Larsen Y., Frithiof R., Sorensen O.E., Kenne E., Scharffetter-Kochanek K., Eriksson E.E., Herwald H., Agerberth B., Lindbom L. B. Neutrophil primary granule proteins HBPand HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murinemacrophages. // J Clin Invest. – 2008. – V. 118. – P. 3491–35028
319. Soehnlein O., Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule protein tune monocyticcell function. // Trends Immunol. – 2009. – V. 30. – P. 511–512.
320. Soehnlein O., Zerneck A., Eriksson E.E., Rothfuchs A.G., Pham C.T., Herwald H., Bidzhekov K., Rottenberg M.E., Weber C., Lindbom L. A. Neutrophil secretion products pave the wayfor inflammatory monocytes. // Blood. - 2008. – V. 112. – P. 1461–1471.
321. Spiekermann K., Roesler J., Emmendoerffer A., Elsner J., Welte K. Functional features of neutrophils induced by G-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. // Leukemia – 1997. – V. 11. – P. 466–78. doi: 10.1038/sj.leu.2400607

322. Spilsberg B., Rise F., Petersen D., Nissen-Meyer J. Thymidine secretion by hybridoma and myeloma cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 342. – P. 221-226.
323. Stadecker M. J., Calderon J., Karnovsky M. L., Unanue E. R. Synthesis and release of thymidine by macrophages. // *J. Immunol.* – 1977. – V. 119. – P. 1738-1743.
324. Stamm C.E., Collins A.C., Shiloh M.U. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. // *Immunol Rev.* – 2015. – V. 264. – P. 204– 19. doi: 10.1111/imr.1226
325. Steinwede K., Maus R., Bohling J., Voedisch S., Braun A., Ochs M, Schmiedl A, Länger F, Gauthier F, Roes J, Welte T, Bange FC, Niederweis M, Bühling F, Maus UA. Cathepsin G and neutrophil elastase contribute to lung-protective immunity against mycobacterial infections in mice. // *J Immunol.* – 2012. – V. 188. – P. 4476– 87. doi: 10.4049/jimmunol.1103346
326. Stek C., Allwood B., Walker N.F., Wilkinson R.J., Lynen L., Meintjes G. The immune mechanisms of lung parenchymal damage in tuberculosis and the role of host-directed therapy. // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 2603. doi: 10.3389/fmicb.2018.02603.
327. Strieter R.M., Kasahara K., Allen R.M., Standiford T.J., Rolfe M.W., Becker F.S., Chensue S.W., Kunkel S.L. Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. // *Am. J. Pathol.* – 1992. – V. 141. – P. 397–407.
328. Sugawara I.T. Udagawa, and H. Yamada. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. // *Infection and Immunity* – 2004. – V. 72. – P. 1804–1806.
329. Summers C., Rankin S. M., Condliffe A. M., Singh N., Peters A. M., and Chilvers E. R., Neutrophil kinetics in health and disease. // *Trends in Immunology.* - 2010. – V. 31. – P. 318– 324.
330. Sunahori K., Yamamura M., Yamana J., Takasugi K., Kawashima M., Yamamoto H., Chazin W.J., Nakatani Y., Yui S., Makino H. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. // *Arthritis Res Ther* – 2006. – V. 8. – P. R69.

331. Sutherland J. S., Jeffries D. J., Donkor S., Walther B., Hill P.C., Adetifa I.M., Adegbola R.A., Ota M.O., High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. // *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland). – 2009. V. 89. - P. 398–404.
332. Sutherland J.S., Loxton A.G., Haks M.C., Kassa D., Ambrose L., Lee J.-S., Ran L., van Baarle D., Maertzdorf J., Howe R., Mayanja-Kizza H., Boom W.H., Thiel B.A., Crampin A.C., Hanekom W., Ota M.O., Dockrell H., Walzl G., Kaufmann S.H., Ottenhoff T.H.; GCGH Biomarkers for TB consortium. Differential gene expression of activating Fcγ receptor classifies active tuberculosis regardless of human immunodeficiency virus status or ethnicity. // *Clin Microbiol Infect* – 2014. – V. 20. – P. O230– 8. doi:10.1111/1469-0691.12383.
333. Swanson R.V., Gupta A., Foreman T.W., Lu L., Choreno-Parra J.A., Mbandi S.K., Rosa B.A., Akter S., Das S., Ahmed M., Garcia-Hernandez M.L., Singh D.K., Esaulova E., Artyomov M.N., Gommerman J., Mehra S., Zuniga J., Mitreva M., Scriba T.J., Rangel-Moreno J., Kaushal D., Khader S.A. Antigen-specific B cells direct T follicular-like helper cells into lymphoid follicles to mediate Mycobacterium tuberculosis control. // *Nat Immunol.* – 2023 – V. 24 – N 5 – P. 855-868. doi: 10.1038/s41590-023-01476-3.
334. Tan B.H., Meinken C., Bastian M., Bruns H., Legaspi A., Ochoa M.T., Krutzik S.R., Bloom B.R., Ganz T., Modlin R.L., Stenger S. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. // *J Immunol* – 2006. – V. 177(3). – P. 1864–1871.
335. Teitelbaum R., Glatman-freedman A., Chen B., Robbins J.B., Unanue E., Casadevall A., Bloom B.R. A mAb recognizing a surface antigen of Mycobacterium tuberculosis enhances host survival. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1998. – V. 95. – P. 15688–93. doi:10.1073/pnas.95.26.15688.
336. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research*, 2017, V. 45 (Database issue): D896-D901. URL: <http://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=Tuberculosis>

337. Thomas J.D., Sideras P., Smith C.I., Vorechovsky I., Chapman V., Paul W.E. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. // *Science* – 1993. – V. 261. – P. :355–358.
338. Tjärnlund A., Rodríguez A., Cardona P.-J., Guirado E., Ivanyi J., Singh M., Troye-Blomberg M., Fernández C. Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. // *Int Immunol* – 2006. – V. 18. – P. 807–16. doi:10.1093/intimm/dx1017.
339. Tobin D.M., Roca F.J., Oh S.F., McFarland R., Vickery T.W., Ray J.P., Ko D.C., Zou Y., Bang N.D., Chau T.T., Vary J.C., Hawn T.R., Dunstan S.J., Farrar J.J., Thwaites G.E., King M.C., Serhan C.N., Ramakrishnan L. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. // *Cell* – 2012. – V. 148. – P. 434–446. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.023
340. Torrado E., Cooper A.M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. // *Cytokine & growth factor reviews* – 2010. – V. 21. – P. 455–462.18.
341. Torrado E., Fountain J.J., Robinson R.T., Martino C.A., Pearl J.E., Rangel-Moreno J., Tighe M., Dunn R., Cooper A.M. Differential and site specific impact of B cells in the protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8(4). – P. e61681. doi: 10.1371/journal.pone.0061681.
342. Trentini M. M., de Oliveira F. M., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A. P. The role of neutrophils in the induction of specific Th1 and Th17 during vaccination against tuberculosis. // *Frontiers in Microbiology* – 2016. – V. 7. – P. 898.
343. Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol* 2006;8:218–32. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x.
344. Tsiganov E.N., Verbina E.M., Radaeva T.V., Sosunov V.V., Kosmiadi G.A., Nikitina I.Y., Lyadova I.V. Gr-1 dim CD11b+ immature myeloid-derived suppressor cells but not neutrophils are markers of lethal tuberculosis infection in mice. // *J. Immunol.* – 2014. – V. 192. – P. 4718–4727.

345. Tsukada S., Saffran D.C., Rawlings D.J., Parolini O., Allen R.C., Klisak I., Sparkes R.S., Kubagawa H., Mohandas T., Quan S., et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. // *Cell* – 1993. – V. 72. – P. 279–290.
346. Tumanov A.V., Grivennikov S.I., Kruglov A.A., Shebzukhov Y.V., Koroleva E.P., Piao Y., Cui C.Y., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. // *Blood* – 2010. – V. 116. – P. 3456–3464.
347. Turcotte K., Gauthier S., Tuite A., Mullick A., Malo D., Gros P. A mutation in the *Icsbp1* gene causes susceptibility to infection and a chronic myeloid leukemia-like syndrome in BXH-2 mice. // *J Exp Med* – 2005. – V. 201. – P. 881-890.
348. Turner J., Frank A.A., Brooks J.V., Gonzalez-Juarrero M., Orme I.M. The progression of chronic tuberculosis in the mouse does not require the participation of B lymphocytes or interleukin-4. // *Exp Gerontol* – 2001. – V. 36. – P. 537–45. doi:10.1016/S0531-5565(00)00257-6
349. Turner O.C., Keefe R.G., Sugawara I., Yamada H., Orme I.M. SWR mice are highly susceptible to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*. // *Infect Immun* – 2003. – V. 71. – P. 5266–72.
350. Ueda Y., Cain D. W., Kuraoka M., Kondo M., Kelsoe G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. // *Journal of Immunology* – 2009. – V. 182(10). – P. 6477–6484.
351. Ulrichs T., Kosmiadi G.A., Jörg S., Pradl L., Titukhina M., Mishenko V, Gushina N., Kaufmann S.H. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. // *J Infect Dis* – 2005. – V. 192. – P. 89–97. doi:10.1086/430621.
352. Ulrichs T., Kosmiadi G.A., Trusov V., Jorg S., Pradl L., Titukhina M., Mishenko V., Gushina N., Kaufmann S.H. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. // *J Pathol* – 2004. V. 204. – P. 217–28.

353. Umemura M., Yahagi A., Hamada S., Begum M.D., Watanabe H., Kawakami K., Suda T., Sudo K., Nakae S., Iwakura Y., Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. // *Journal of Immunology* – 2007. – V. 178. – P. 3786–3796.
354. van Rensburg I.C., Kleynhans L., Keyser A., Walzl G., Loxton A.G. B-cells with a FasL expressing regulatory phenotype are induced following successful anti-tuberculosis treatment. // *Immunity, Inflamm Dis* - 2017A. – V. 5. – P. 57–67. doi:10.1002/iid3.140.
355. van Rensburg I.C., Loxton A.G. Killer (FASL regulatory) B cells are present during latent TB and are induced by BCG stimulation in participants with and without latent tuberculosis. // *Tuberculosis (Edinb)* – 2018. – V. 108. – P. 114–7. doi:10.1016/j.tube.2017.11.010.
356. van Rensburg I.C., Wagman C., Stanley K., Beltran C., Ronacher K., Walzl G., Loxton A.G. Successful TB treatment induces B-cells expressing FASL and IL5RA mRNA. // *Oncotarget* - 2017B. – V. 8. – P. 2037–2043. doi:10.18632/oncotarget.12184.
357. Velmurugan K., Chen B., Miller J.L., Azogue S., Gurses S., Hsu T., Glickman M., Jacobs W.R. Jr., Porcelli S.A., Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. // *PLoS Pathog.* – 2007. – V. 3. – P. e110.
358. Vetrie D., Vorechovský I., Sideras P., Holland J., Davies A., Flinter F., Hammarström L., Kinnon C., Levinsky R., Bobrow M., et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the scr family of protein-tyrosine kinases. // *Nature* – 1993. – V. 361. – P. 226–233.
359. Via, L. E. Lin P.L., Ray S.M., Carrillo J., Allen S.S., Eum S.Y., Taylor K., Klein E., Manjunatha U., Gonzales J., Lee E.G., Park S.K., Raleigh J.A., Cho S.N., McMurray D.N., Flynn J.L., Barry C.E. 3rd. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. // *Infect. Immun.* – 2008. – V. 76. – P. 2333–2340.

360. Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. // *Cell*. – 1993. – V. 73(3). – P. 469-85. doi: 10.1016/0092-8674(93)90135-d.
361. Volkman H.E., Pozos T.C., Zheng J., Davis J.M., Rawls J.F., Ramakrishnan L. // Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. – *Science* – 2010. – V. 327. – P. 466–469.
362. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. // *Biochemistry (Mosc)*. – 2014. – V. 79(12). – P. 1286-96.
363. Voskuil M.I., Bartek I.L., Visconti K., Schoolnik G.K. The response of *Mycobacterium Tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. // *Front Microbiol*. – 2011. – V. 2. – P. 105. doi: 10.3389/fmicb.2011.00105
364. Vyas S.P., Goswami R. Striking the right immunological balance prevents progression of tuberculosis. // *Inflamm Res*. – 2017. - V. - 66(12). – P. 1031-1056. doi: 10.1007/s00011-017-1081-z.
365. Wahid R., Simon R., Zafar S.J., Levine M.M., Sztejn M.B. Live oral typhoid vaccine Ty21a induces cross-reactive humoral immune responses against salmonella enterica serovar Paratyphi A and S. Paratyphi B in humans. // *Clinical and vaccine immunology* – 2012. – V. 19(6). – P. 825–34. <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00058-12>.
366. Wamala D., Buteme H.K., Kirimunda S., Kallenius G., Joloba M. Association between human leukocyte antigen class II and pulmonary tuberculosis due to mycobacterium tuberculosis in Uganda. // *BMC Infect Dis*. – 2016. – V. 16. – P. 23. doi: 10.1186/s12879-016-1346-0.
367. Wang Y.S., He X., Du Y., Su J., Su J., Gao M., Ma Y., Hua S., Quan F., Liu J., Zhang Y. Transgenic cattle produced by nuclear transfer of fetal fibroblasts carrying *Ipr1* gene at a specific locus. // *Theriogenology* – 2015. – V. 84. – P. 608-16.
368. Warnatsch A., Tsourouktsoglou T.-D., Branzk N., Wang Q., Reincke S., Herbst S., Gutierrez M., Papayannopoulos V. Reactive oxygen species localization programs

- inflammation to clear microbes of different size. // *Immunity* – 2017. - V. 46. – P. 421–32. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.013
369. Watanabe N., Suzuki J., Kobayashi Y. Role of calcium in tumor necrosis factor- α production by activated macrophages. // *J Biochem* – 1996. – V. 120(6). – P. 1190-5.
370. Weber S.S., Joller N., Kuntzel A.B., Spörri R., Tchang V.S., Scandella E., Rösli C., Ludewig B., Hilbi H., Oxenius A. Identification of Protective B Cell Antigens of *Legionella Pneumophila*. // *Journal of immunology* – 2012. – V. 189(2). – P. 841–49. <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1200794>.
371. Weisbart R.H., Golde D.W., Clark S.C., Wong G.G., Gasson J.C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. // *Nature* – 1985. – V. 314. – P. 361–3.
372. Weiss S.J. Tissue destruction by neutrophils. // *N Engl J Med*. – 1989. – V. 320. – P. 365– 76. doi: 10.1056/NEJM198902093200606
373. Wengner A.M., Pitchford S.C., Furze R.C., Rankin S.M. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. // *Blood*. – 2008. – P. 111(1). – P. 42-9. doi: 10.1182/blood-2007-07-099648.
374. Williams A., Orme I.M. Animal Models of Tuberculosis: An Overview. // *Microbiol Spectr*. – 2016. – V. 4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.TB2-0004-2015.
375. Williams A., Reljic R., Naylor I., Clark S.O., Falero-Diaz G., Singh M., Challacombe S., Marsh P.D., Ivanyi J., Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. // *Immunology* – 2004 – V. 111 – P. 328 – 333. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01809.x.
376. Winchell C.G., Mishra B.B., Phuah J.Y., Saqib M., Nelson S.J., Maiello P., Causgrove C.M., Ameel C.L., Stein B., Borish H.J., White A.G., Klein E.C., Zimmerman M.D., Dartois V., Lin P.L., Sasseti C.M., Flynn J.L. Evaluation of IL-

- 1 blockade as an adjunct to linezolid therapy for tuberculosis in mice and macaques. // *Front Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 891. doi: 10.3389/fimmu.2020.00891.
377. Winter A J., Duncan J.R., Santisteban C.G., Douglas J.T., Adams L.G. Capacity of Passively Administered Antibody to Prevent Establishment of *Brucella Abortus* Infection in Mice. // *Infection and immunity* – 1989. – V. 57(11). – P. 3438–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509362>
378. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. // *Laboratory Investigation.* – 2000. - V. 80. – P. 617–653.
379. Wolf A. J., Linas B., Trevejo-Nuñez G. J., Kincaid E., Tamura T., Takatsu K., Ernst J. D. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. // *J. Immunol.* – 2007. – V. 179. – P. 2509–2519.
380. Wong S.-C., Puaux A.-L., Chittezhath M., Shalova I., Kajiji T.S., Wang X., Abastado J.P., Lam K.P., Biswas S.K. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. // *Eur J Immunol* – 2010. – V. 40. – P. 2296–307. doi:10.1002/eji.200940288.
381. Wright H.L., Thomas H.B., Moots R.J., Edwards S.W. RNA-Seq reveals activation of both common and cytokine-specific pathways following neutrophil priming. // *PLoS ONE* – 2013. – V. 8. – P. e58598. doi: 10.1371/journal.pone.0058598
382. Wu F., Zhang W., Zhang L., Wu J., Li C., Meng X., Wang X., He P., Zhang J. NRAMP1, VDR, HLA-DRB1, and HLA-DQB1 gene polymorphisms in susceptibility to tuberculosis among the Chinese Kazakh population: a case-control study. // *Biomed Res Int.* – 2013. – V. 2013. – P. 484535. doi: 10.1155/2013/484535.
383. Wu Y., Zhang S., Peng W., Li K., Li K., Jiang J., Lin J.H., Cai Y.M. Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. // *J Int Med Res* – 2009. – V. 37. – P. 1742–9. doi:10.1177/147323000903700610.

384. Yan B.S., Kirby A., Shebzukhov Y.V., Daly M.J., Kramnik I. Genetic architecture of tuberculosis resistance in a mouse model of infection. // *Genes Immun* – 2006. – V. 7. – P. 201–10.
385. Yang C.T., Cambier C.J., Davis J.M., Hall C.J., Crosier P.S., Ramakrishnan L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. // *Cell Host Microbe* – 2012. – V. 12(3). – P. 301–312
386. Yeremeev V., Linge I., Kondratieva T., Apt A. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. // *Tuberculosis (Edinb)* – 2015. – V. 95. – P. 447–51. doi: 10.1016/j.tube.2015.03.007
387. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. // *J Leukoc Biol.* – 2004. – V. 75. – P. 39–48. doi: 10.1189/jlb.0403147
388. Zen K., Liu Y. Role of different protein kinases in fMLP-induced neutrophil transmigration. // *Immunobiol* – 2008. – V. 213. – P. 13–23.
389. Zhang M., Wang Z., Graner M.W., Yang L., Liao M., Yang Q., Gou J., Zhu Y., Wu C., Liu H., Zhou B., Chen X. B cell infiltration is associated with the increased IL-17 and IL-22 expression in the lungs of patients with tuberculosis. // *Cell Immunol* – 2011. – V. 270. – P. 217–23. doi:10.1016/j.cellimm.2011.05.009.
390. Zhang M., Zeng G., Yang Q., Zhang J., Zhu X., Chen Q., Suthakaran P., Zhang Y., Deng Q., Liu H., Zhou B., Chen X. Anti-tuberculosis treatment enhances the production of IL-22 through reducing the frequencies of regulatory B cell. // *Tuberculosis* – 2014. – V. 94. – P. 238–44. doi:10.1016/j.tube.2013.12.003.
391. Zhang M., Zheng X., Zhang J., Zhu Y., Zhu X., Liu H., Zeng M., Graner M.W., Zhou B., Chen X. CD19(+)CD1d(+)CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. // *Cell Immunol* – 2012. – V. 274. – P. 89–97. doi:10.1016/j.cellimm.2012.01.007.
392. Zimmermann N., Thormann V., Hu B., Köhler A.B., Imai-Matsushima A., Loch C., Arnett E., Schlesinger L.S., Zoller T., Schürmann M., Kaufmann S.H., Wardemann H. Human isotype-dependent inhibitory antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis*. // *EMBO Mol. Med.* – 2016 – V. 8 – P. 1325–1339. doi: 10.15252/emmm.201606330.