



Взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток и микобактерий туберкулеза *in vitro*

С. Н. БЕЛОГОРОДЦЕВ, А. П. ЛЫКОВ, Е. К. НЕМКОВА, Я. Ш. ШВАРЦ

ФБГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» МЗ РФ, г. Новосибирск, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: в эксперименте *in vitro* сравнивали фагоцитарные показатели мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и макрофагов в отношении микобактерий туберкулеза, оценивали способность МСК и макрофагов лизировать микобактерии или поддерживать их внутриклеточный рост, их влияние на формирование фенотипической лекарственной устойчивости микобактерий, а также влияние микобактерий туберкулеза на тип клеточной гибели МСК.

Материалы и методы. В работе были использованы линейные мыши *Balb/c*, самцы возрастом от 6 до 8 недель. МСК костного мозга получали из бедренных и большеберцовых костей путем дальнейшего культивирования, перитонеальные макрофаги элиситировали 4% альфа-глюканом. Внутриклеточное содержание микобактерий подсчитывали с помощью конфокального микроскопа при увеличении $\times 400$. Определение чувствительности микобактерий к изониазиду и формирование фенотипической лекарственной устойчивости после культивирования МСК и макрофагов с патогеном на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсен оценивали путем подсчета КОЕ. Количество апоптотических и некротизированных МСК и макрофагов определяли через 5 суток после инфицирования, используя проточный цитофлуориметр.

Результаты. На 1-е сутки общее количество фагоцитированных МБТ, как и количество фагоцитарно-активных макрофагов, превышает соответствующие показатели для МСК более чем в 2 раза. МСК фагоцитируют микобактерии туберкулеза в меньшем количестве, но размножение патогена в них происходит активнее: количество КОЕ после 7-ми суток культивирования клеток с патогеном превышало соответствующий показатель после 24 часов культивирования почти в 50 раз. В культурах инфицированных МСК, культивируемых в течение 7 суток, независимо от присутствия изониазида отмечается бурный рост микобактерий туберкулеза. В культуре макрофагов на 5-е сутки после инфицирования микобактериями туберкулеза количество клеток в состоянии некроза было в 2,7 раза больше, чем неинфицированных некротизированных макрофагов, но количество апоптотических клеток в этих группах различалось незначительно. В культуре МСК инфицированных клеток в состоянии некроза было в 8,5 раз больше, чем неинфицированных некротизированных МСК, и число некротизированных МСК в 4,5 раза превосходило число МСК с апоптозом, тогда как в культуре инфицированных макрофагов число некротизированных клеток было таким же, как число апоптотических клеток. Обработка изониазидом МСК, в отличие от макрофагов, не сдерживала внутриклеточную пролиферацию МБТ.

Заключение. МСК обладают способностью фагоцитировать микобактерии, но делают это менее активно, чем макрофаги и, в отличие от макрофагов, не способны сдерживать размножение микобактерий туберкулеза. Микобактерии обладают фенотипической лекарственной устойчивостью в МСК. В МСК при инфицировании микобактериями туберкулеза отмечается выраженный сдвиг типа клеточной гибели в сторону некроза, что может приводить к диссеминации патогена и развитию локальных деструктивных изменений.

Ключевые слова: стромальные клетки, некроз, апоптоз, фагоцитоз, туберкулез.

Для цитирования: Белгородцев С. Н., Лыков А. П., Немкова Е. К., Шварц Я. Ш. Взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток и микобактерий туберкулеза *in vitro* // Туберкулез и болезни лёгких. – 2023. – Т. 101, № 1S. – С. 57–63. <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-1S-57-63>

Interaction between mesenchymal stromal cells and tuberculous mycobacteria *in vitro*

S. N. BELOGORODTSEV, A. P. LYKOV, E. K. NEMKOVA, YA. SH. SCHWARTZ

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Russian Ministry of Health, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

The objective: in an *in vitro* experiment, we compared phagocytic parameters of mesenchymal stromal cells (MSCs) and macrophages to tuberculous mycobacteria, assessed the ability of MSCs and macrophages to lyse mycobacteria or maintain their intracellular growth, their effect on formation of phenotypic drug resistance of mycobacteria, as well as the effect of tuberculous mycobacteria on the type of MSCs cell death.

Subjects and Methods. *Balb/c* male mice, aged 6 to 8 weeks, were used in the experiment. Bone marrow MSCs were obtained from femurs and tibias by further cultivation, peritoneal macrophages were elicited with 4% alpha-glucan. The intracellular content of mycobacteria was counted using a confocal microscope with $\times 400$ magnification. Susceptibility of mycobacteria to isoniazid and development of phenotypic drug resistance after culturing MSCs and macrophages with MTB on Lowenstein–Jensen medium was assessed by counting CFU. In 5 days after the infection, the number of apoptotic and necrotic MSCs and macrophages was determined by a flow cytometer.

Results. On Day 1, the total number of phagocytosed MTB, as well as the number of phagocytic-active macrophages, exceeds the corresponding figures for MSCs more than twice. MSCs phagocytize tuberculous mycobacteria in a smaller amount, but MTB reproduces in them more actively: the number of CFU after 7 days of cell cultivation with MTB exceeded the corresponding parameter by almost 50 times after 24 hours of cultivation. In cultures of infected MSCs cultivated for 7 days, regardless of the

presence of isoniazid, there was a rapid growth of tuberculous mycobacteria. On Day 5 after infection of macrophage culture with tuberculous mycobacteria, the number of necrotic cells was 2.7 times greater than that of uninfected necrotic macrophages, but the number of apoptotic cells in these groups differed slightly. In the culture of MSCs, there were 8.5 times more infected necrotic cells versus uninfected necrotic MSCs, and the number of necrotic MSCs was 4.5 times higher than the number of MSCs with apoptosis, while in the culture of infected macrophages, the number of necrotic cells was the same as number of apoptotic cells. Unlike macrophages, treatment of MSCs with isoniazid did not inhibit the intracellular proliferation of MTB.

Conclusion. MSCs have the ability to phagocytose mycobacteria, but they do it less actively than macrophages and, unlike macrophages, they are not able to restrain the reproduction of tuberculous mycobacteria. Mycobacteria have phenotypic drug resistance in MSCs. In MSCs, when infected with tuberculous mycobacteria, there is a pronounced shift towards necrosis in the type of cell death, which can lead to dissemination of MTB and development of local destructive changes.

Key words: stromal cells, necrosis, apoptosis, phagocytosis, tuberculosis.

For citation: Belogorodtsev S.N., Lykov A.P., Nemkova E.K., Schwartz Ya.Sh. Interaction between mesenchymal stromal cells and tuberculous mycobacteria *in vitro*. *Tuberculosis and Lung Diseases*, – 2023. vol. 101, no. 1S, pp. 57–63. (In Russ.) <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-1S-57-63>

Для корреспонденции:

Немкова Елизавета Кирилловна
E-mail: elizaveta.nemkova@mail.ru

Correspondence:

Elizaveta K. Nemkova
Email: elizaveta.nemkova@mail.ru

Введение

Макрофаги традиционно считаются основным типом клеток, являющимся резервуаром для *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), как при активных, так и при латентных формах туберкулеза. Макрофаги имеют широкий спектр рецепторов, посредством которых они осуществляют фагоцитоз МБТ, а также мощный бактериолитический аппарат, способный приводить к киллингу возбудителя заболевания. Но способностью к фагоцитозу МБТ обладают многие другие типы клеток: альвеолоциты, фибробласты, адипоциты, мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Их роль в патогенезе туберкулезной инфекции изучена в гораздо меньшей степени.

Впервые роль МСК в развитии туберкулеза была показана в 2010 году [10]. В экспериментах на мышах продемонстрировано, что МСК в значительном количестве присутствуют в составе туберкулезных гранул, где оказывают иммуносупрессивное действие за счет выработки оксида азота, а также способствуют дифференцировке и накоплению регуляторных Т-лимфоцитов. Присутствие МСК в туберкулезных очагах у человека было показано при исследовании лимфатических узлов при туберкулезном лимфадените. МСК не считаются профессиональными фагоцитами, но их способность поглощать МБТ показана во многих исследованиях. В исследовании 2013 года было показано, что МБТ могут инфицировать и успешно выживать в МСК, так, при латентной туберкулезной инфекции у человека и мыши МБТ выявляются в МСК легких и костного мозга [2]. На корнелловской модели латентной туберкулезной инфекции у мышей показано, что после лечения пипразинамидом и изониазидом в течение 90 дней живые *M. tuberculosis* сохраняются в МСК костного мозга в гипоксических участках. Введение этих МСК костного мозга здоровым животным вызывало развитие туберкулеза [4]. На основе данных ПЦР было доказано

персистирование МБТ в костном мозге людей, прошедших противотуберкулезную терапию, при этом выделенные МСК экспрессировали повышенный уровень HIF-1 и низкий уровень CD146 (*hypoxia down-regulated cell surface marker*). В ряде исследований было показано, что МСК успешно фагоцитируют МБТ через scavenger-рецепторы, но при этом в фагоцитированных МСК микобактериях туберкулеза индуцируется экспрессия генов дормантности, они перестают делиться и становятся нечувствительными к изониазиду, то есть демонстрируют фенотипическую лекарственную устойчивость [7]. Подавление синтеза липидов трасцином С приводило к исчезновению дормантности у микобактерий туберкулеза [3]. В то же время есть исследования, демонстрирующие, что в МСК микобактерии сохраняют способность пролиферировать, то есть могут быть и не в дормантном состоянии, но, тем не менее, при этом МСК-резидентные микобактерии приобретают фенотипическую лекарственную резистентность, что было связано с более выраженной экспрессией эффлюксных помп АВСС1, АВСС2 в МСК [5]. Интересно, что, в отличие от макрофагов, ИФН-гамма и ФНО-альфа способствовали росту микобактерий в МСК.

В настоящее время остаются открытыми многие вопросы, касающиеся взаимоотношений МСК и МБТ, исследований на эту тему мало, и представленные данные зачастую противоречивы.

Цель исследования

В эксперименте *in vitro* сравнить фагоцитарные показатели МСК и макрофагов в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, оценить способность МСК и макрофагов лизировать их или поддерживать их внутриклеточный рост, влиять на формирование фенотипической лекарственной устойчивости, а также исследовать влияние *Mycobacterium tuberculosis* на тип клеточной гибели (апоптоз, некроз) в МСК.

Материалы и методы

В работе были использованы МСК костного мозга и перитонеальные макрофаги линейных мышей *Balb/c* – самцов возрастом от 6 до 8 недель. Все работы с экспериментальными животными проводились в соответствии с международными и национальными документами, регламентирующими проведение экспериментов на лабораторных животных, с соблюдением всех современных стандартов биоэтики (*Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях*).

Для получения МСК использовали аспират костного мозга из бедренных и большеберцовых костей, который культивировали в культуральных матрасах площадью 75 см² (TPP, Швейцария) в полной среде на основе RPMI-1640 (Панэко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1% смеси антибиотик/антимикотик (Gibco, США), 2 мМ L-глутамин и 5 мМ HEPES-буфера (Sigma, США) с начальной плотностью 300–500 тыс. клеток на см² в условиях CO₂-инкубатора (Sanyo, Япония) при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности. Пассирование МСК осуществляли с помощью Версен-Трипсина 0,25% (Панэко, Россия), для работы использовали клетки 3–4-го пассажа, фенотип был подтвержден по присутствию CD73, CD90, CD105 и отсутствию CD45.

Для элиситирования перитонеальных макрофагов в брюшную полость мышам вводили 4% альфа-глукокан, через 3 суток осуществляли эвтаназию животных и лаваж перитонеальной полости. Клетки перитонеального лаважа осаждали центрифугированием и ресуспендировали в полной культуральной среде, по составу идентичной среде для МСК. Необходимое количество МСК и макрофагов высаживали в лунки 24-луночного или 6-луночного планшетов (TPP, Швейцария) в количестве 1 млн/см² в полной культуральной среде. Инфицирование МСК и макрофагов осуществляли в соотношении микобактерии: клетка как 5:1 с последующей сменной культуральной среды (через 16–18 часов) для удаления нефагоцитированных микобактерий. Для инфицирования использовали референсный лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительный ко всем противотуберкулезным препаратам.

Для визуализации внутриклеточных микобактерий культуры МСК и макрофагов фиксировали 1% раствором формалина с последующим окрашиванием флуоресцентными красителями *Auromine O-Rhodamine B* (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя. После окраски внутриклеточное содержание микобактерий подсчитывали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM-700 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия) при увеличении × 400. Для подсчета использовали сканирование лунок в режиме “tile scan”. Скан клеточного поля был представлен сум-

мой 25-ти квадратов со стороной 512 пикселей. Среднее количество клеток, приходящихся на одно поле, варьировало от 700 до 1500 для МСК и от 1200 до 3000 для макрофагов.

Для определения чувствительности микобактерий к изониазиду и формирования фенотипической лекарственной устойчивости после культивирования МСК и макрофагов с патогеном в течение 1 суток к культуральной среде добавляли изониазид в концентрации 0,05 мг/мл. Через 7 суток культивирования клетки снимали с культурального пластика с использованием спраппера, полученную суспензию высевали на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена. Оценка количества колониеобразующих единиц (КОЕ) проводилась визуально через 10 недель.

Количество МСК и макрофагов в состоянии апоптоза или некроза было определено через 5 суток после инфицирования с использованием окраски *Annexin V-Propidium Iodide* (SigmaAldrich, Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman, США) с использованием программного обеспечения *CytExpert*.

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе *Statistica 10.0* для *Windows* с определением нормальности распределения при помощи w-критерия Шапиро-Уилка. Данные в таблице приведены в виде средних и стандартного отклонения (M±SD). Для оценки статистической значимости различий между экспериментальными группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой по Бонферрони (*Bonferroni post hoc test*) и считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Было показано, что на 1-е сутки общее количество фагоцитированных МБТ, как и количество фагоцитарно-активных макрофагов, превышает соответствующие показатели для МСК более чем в 2 раза ($p < 0,05$) (табл. 1). В то же время количество МБТ в одной фагоцитарно-активной клетке не отличалось для обеих популяций клеток.

МСК, как и макрофаги, являются гетерогенными популяциями клеток и сохраняют эту неоднородность при выделении и культивировании *ex vivo*. В зависимости от функционального статуса, спектр и количество рецепторов, посредством которых происходит фагоцитоз, МБТ у этих двух видов клеток сильно отличается. На мембране макрофага представлен практически весь спектр фагоцитарных рецепторов: mannose receptors, DC-SIGN, Dectin-1, complement receptors CR1, CR3, CR4, surfactant protein receptors A, D, scavenger receptors и другие [13], в то время как на МСК описаны лишь рецепторы группы scavenger, а распределение большинства дру-

Таблица 1. Количество МБТ в клеточных культурах МСК и макрофагов (МФ) в разные сроки культивирования (в перерасчете на 100 клеток)

Table 1. The amount of MTB in cell cultures of MSCs and macrophages (MF) at different periods of cultivation (calculated per 100 cells)

Показатель	МСК			МФ		
	1 сутки	7 суток	14 суток	1 сутки	7 суток	14 суток
Общее количество фагоцитируемых МБТ	8,86±0,56 # * ^	22,15±1,05 ^	67,78±3,52	20,35±0,79 *	13,75±1,43 ^	35,48±2,55
Количество фагоцитарно-активных клеток	17,01±0,72 # * ^	34,08±1,54 ^	68,16±4,56	34,86±2,48	31,40±1,67	43,15±2,06
Количество МБТ в одной фагоцитарно-активной клетке	0,52±0,33	0,65±0,12	0,99±0,24	0,58±0,18	0,43±0,17	0,82±21

Примечание: $p < 0,05$. # – между МСК и макрофагами, * – со сроком 7 суток, ^ – со сроком 14 суток.

Note: $p < 0.05$ # - between MSCs and macrophages, * - after 7 days, ^ - after 14 days

гих остается неясным. Предполагается, что МСК интернализируют МБТ через три типа рецепторов, относящихся к группе *scavenger-receptor: MARCO, SR-A* и *SR-B1* [7]. Поскольку МСК не являются «профессиональными» фагоцитами, по-видимому, спектр клеток в культуре, экспрессирующих *scavenger-receptors*, относительно невелик.

Динамика количества МБТ в инфицированной культуре (табл. 1) отражает способность клеток, фагоцитировавших МБТ, сдерживать их рост. Изменение отношения фагоцитированных микобактерий к числу всех клеток в группах МСК и макрофагов на 1-е, 7-е и 14-е сутки инкубирования клеток с патогеном показало, что эти группы статистически достоверно различаются. В культурах макрофагов на 7-е сутки отмечалось достоверное уменьшение в 1,48 раза количества МБТ, к 14 суткам происходила пролиферация внутриклеточных МБТ с увеличением их количества в 2,58 раза (в 1,75 раза выше по сравнению с первыми сутками). В МСК рост МБТ начинался уже в первую неделю – на 7-е сутки вырос в 2,5 раза, а к 14-м суткам еще в 3,06 раза. Таким образом, к 14-ти суткам количество МБТ в культуре увеличилось в 7,65 раза по сравнению 1-ми сутками. Причем необходимо отметить, что прирост этого показателя происходил за счет увеличения фагоцитарно-активных клеток, в то время как количество МБТ в одной клетке для МСК и макрофагов достоверно не отличалось.

Динамика количества МБТ в культурах клеток показала гораздо меньшую способность МСК сдерживать рост микобактерий в сравнении с макрофагами, которые за счет своих развитых бактериолитических механизмов сначала подавляют внутриклеточный рост патогена, а потом способствуют снижению его пролиферации.

В литературе для МСК описан только один способ киллинга микобактерий – аутофагия [7]. Есть и данные, что после проникновения в МСК микобактерии располагаются не в фагосомах, а в цитозоле клетки между элементами цитоскелета [3]. Это способствует их более активному росту, чем в макрофагах. Кроме того, полученные данные не соответствуют гипотезе ряда исследователей [2, 7] о том, что в МСК микобактерии приобретают dormantный

статус. Есть только одно исследование [9], которое показывает, что в МСК происходит активная экспансия МБТ.

Для исследования чувствительности к антибиотикам фагоцитированных МБТ в МСК и макрофагах был выбран микробиологический метод, так как в указанный срок наблюдения (7 суток) потерявшие жизнеспособность МБТ могут еще сохраняться внутри клеток, окрашиваться аурамин-родамином и визуализироваться при конфокальной микроскопии. При посеве на среду Левенштейна-Йенсена культур макрофагов, культивированных без изониазида 24 часа и 7 суток, количество КОЕ во второй группе было значимо больше в 1,6 раза, в то время как в группе с изониазидом (в течение 7 суток) количество КОЕ было соотносимым с таковым у группы макрофагов, культивированных с патогеном в течение 24 часов (табл. 2). В культурах инфицированных МСК, культивируемых в течение 7 суток, независимо от присутствия изониазида отмечался бурный рост микобактерий туберкулеза: количество КОЕ не отличалось в контрольной (без изониазида) и опытной (с изониазидом) группах.

Таблица 2. Количество КОЕ при посевах культур, инфицированных МСК и макрофагов (МФ), культивированных без и в присутствии изониазида, через 24 часа и 7 суток

Table 2. The number of CFU in cultures of infected MSCs and macrophages (MF), cultivated without and with isoniazid, after 24 hours and 7 days

Показатель		МСК	МФ
Через 24 часа после инфицирования		2,53±0,67 #	11,58±1,24
Через 7 суток после инфицирования	ИЗО (-)	121,44±1,86 # *	18,53±0,83 * †
	ИЗО (+)	115,86±2,56 # *	12,82±1,63

Примечание: $p < 0,05$. # – между МСК и МФ, * – между сроками 24 часа и 7 суток, † – между группами ИЗО (+) и ИЗО (-). ИЗО (+), ИЗО (-) с добавлением или без добавления изониазида в культуральную среду.

Note: $p < 0.05$ # – between MSC and MF, * – between 24 hours and 7 days, † – between ISO+ and ISO- groups. ISO+, ISO- with or without the addition of isoniazid to the nutrient medium.

Кроме того, данные микробиологического метода еще раз подтвердили результаты предыдущего эксперимента – МСК фагоцитируют МБТ в меньшем количестве, но размножение патогена в них происходит активно: количество КОЕ после 7-ми суток культивирования клеток с патогеном превышало соответствующий показатель после 24 часов культивирования почти в 50 раз.

В целом полученные данные показывают, что МБТ, фагоцитированные МСК, демонстрируют фенотипическую лекарственную устойчивость. Но это обусловлено не дормантным статусом, а другими механизмами, одним из них может являться относительно большое количество эффлюксных помп на створочных клетках, в частности на МСК, которые способствуют выбросу из клетки экзогенных соединений, в том числе и антибиотиков [9].

Тип клеточной гибели (апоптоз или некроз) является важным фактором в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, определяющим прогрессирование заболевания или его сдерживание после первичного контакта патогена с клеткой. Показано, что апоптоз клеток способствует сдерживанию распространения МБТ, их последующему эффективно лизису макрофагами посредством эффероцитоза [6, 11]. При гибели клеток посредством некроза происходит выход патогена во внеклеточную среду с его последующей диссеминацией. Кроме того, выход в межклеточное пространство большого количества так называемых «молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением» приводит к потенцированию локального воспалительного ответа,

иммуноопосредованной деструкции окружающих тканей и формированию полостей распада [1, 8].

При сравнении неинфицированных культур МСК и макрофагов доля клеток в состоянии апоптоза и некроза была сопоставима (табл. 3). В культуре макрофагов на 5-е сутки после инфицирования МБТ количество клеток в состоянии некроза было статистически значимо больше (в 2,7 раз), чем у неинфицированных макрофагов, но количество апоптотических клеток в этих группах различалось незначительно. В случае МСК отмечен значительный сдвиг в сторону некротической клеточной гибели (инфицированных МСК в состоянии некроза было в 8,5 раз больше, чем неинфицированных некротизированных МСК). Количество МСК в состоянии некроза на 5-е сутки после инфицирования статистически значимо превосходило число МСК с апоптозом (в 4,5 раза), тогда как в культуре инфицированных макрофагов число некротизированных клеток было таким же, как число апоптотических клеток.

Заключение

Таким образом, МСК обладают способностью фагоцитировать микобактерии, но делают это менее активно, чем макрофаги. Динамика внутриклеточного количества микобактерий в МСК отражает их неспособность сдерживать размножение микобактерий туберкулеза в сравнении с макрофагами, которые за счет своих развитых бактериолитических механизмов эффективно подавляют внутриклеточную пролиферацию патогена. В МСК пролиферация микобактерий начиналась с первых суток и происходила более активно, чем в макрофагах.

Обработка изониазидом МСК, в отличие от макрофагов, не сдерживала внутриклеточную пролиферацию МБТ, что свидетельствует о наличии фенотипической лекарственной устойчивости микобактерий в МСК. Кроме того, при инфицировании микобактериями туберкулеза в МСК отмечался выраженный сдвиг типа клеточной гибели в сторону некроза, что может приводить к диссеминации патогена и развитию локальных деструктивных изменений. Но в то же время, как показано в ряде клинических исследований [12], на фоне активно текущего туберкулезного процесса и выраженной иммуноопосредованной альтерации тканей, противовоспалительное влияние МСК может оказывать положительный эффект, выражающийся в более быстром заживлении очагов туберкулезной альтерации и абациллировании.

Таблица 3. Количество клеток в состоянии некроза и апоптоза на 5-е сутки в культурах МСК и МФ без и при инфицировании МБТ (по отношению к общему количеству клеток, %)

Table 3. The number of cells in a state of necrosis and apoptosis on Day 5 in MSC and MF cultures infected and not infected with tuberculous mycobacteria (as per the total number of cells, %)

Показатель	МСК		МФ	
	МБТ (-)	МБТ (+)	МБТ (-)	МБТ (+)
Доля апоптотических клеток	10,17±2,21 #	2,59±1,09	9,13±2,71	7,82±1,62
Доля некротических клеток	1,37±0,76 #	11,65±2,38	2,49±1,08 #	6,63±2,54
Доля погибающих клеток (апоптоз + некроз)	11,17±2,08	14,24±1,12	11,62±3,15	14,94±0,97

Примечание: $p < 0,05$. # – между МБТ (-) и МБТ (+).

Note: $p < 0.05$ # – between MTB – and MTB+

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare there is no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

1. Adigun R., Basit H., Murray J. Necrosis. Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). // StatPearls – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2020. – P. 12.
2. Das B., Kashino S.S., Pulu I., Kalita D., Swami V., Yeager H., Felsher D.W., Campos-Neto A. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant *Mycobacterium tuberculosis* // Science Translational Medicine. – 2013. – Vol. 5. – № 170. – P. 170.
3. Fatima S., Kamble S., Dwivedi V., Bhattacharya D., Kumar S., Ranganathan A., Kaer L., Mohanty S., Das G. *Mycobacterium Tuberculosis* Programs Mesenchymal Stem Cells to Establish Dormancy and Persistence. // The Journal of Clinical Investigation. – 2020. – Vol. 130, № 2. – P. 655–661.
4. Garhyan, J., Bhuyan S., Pulu I., Kalita D., Das B., Bhatnagar R. Preclinical and Clinical Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* Persistence in the Hypoxic Niche of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells after Therapy. // The American Journal of Pathology. – 2015. – Vol. 185, № 7. – P. 1924–1934.
5. Jain N., Kalam H., Singh L., Sharma V., Kedia S., Das P., Ahuja V., Kumar D. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to *Mycobacterium tuberculosis*. // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 3062.
6. Karaji N., Sattentau Q.J. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. // Front. Immunol. – 2017. – Vol. 8. – P. 1863.
7. Khan A., Mann L., Papanna R., Lyu M. A., Singh C. R., Olson S, Eissa N. T., Cirillo J., Das G., Hunter R. L., Jagannath C. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 15010.
8. Laskin D. L., Sunil V. R., Gardner C. R., Laskin J. D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? // Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2011. – Vol. 51. – P. 267–288.
9. Neharika J., Haroon K., Lakshyaveer S., Sharma V., Kedia S., Das P., Ahuja V., Kumar D. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to *Mycobacterium tuberculosis*. // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 3062.
10. Raghuvanshi S., Sharma P., Singh S., Kaer L. V. Das G. *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. // Proceedings of the National Academy of Science of the USA. – 2010. – Vol. 107, № 50. – P. 21653–21658.
11. Shirato K., Kasuga K., Sato S., Ishii H. Physiological Role of Alveolar Macrophage in Acute Lower Respiratory Tract Infection: Phagocytosis and Aging // Phagocytosis – Main Key of Immune System [Working Title]. – IntechOpen. – 2023. – P. 23.
12. Skrahin A., Ahmed R. K., Ferrara G., Rane L., Poiret T., Isaikina Y., Skrahina A., Zumla A., Maeurer M. J. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial // Lancet Respir Med. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 108–122.
13. Stamm C. E., Collins A. C., Shiloh M. U. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. // Immunological Reviews. – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 204–219.
1. Adigun R., Basit H., Murray J. Necrosis. Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2020, pp. 12.
2. Das B., Kashino S.S., Pulu I., Kalita D., Swami V., Yeager H., Felsher D.W., Campos-Neto A. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science Translational Medicine*, 2013, vol. 5, no. 170, pp. 170.
3. Fatima S., Kamble S., Dwivedi V., Bhattacharya D., Kumar S., Ranganathan A., Kaer L., Mohanty S., Das G. *Mycobacterium Tuberculosis* Programs Mesenchymal Stem Cells to Establish Dormancy and Persistence. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020, vol. 130, no. 2, pp. 655–661.
4. Garhyan, J., Bhuyan S., Pulu I., Kalita D., Das B., Bhatnagar R. Preclinical and Clinical Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* Persistence in the Hypoxic Niche of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells after Therapy. *The American Journal of Pathology*, 2015, vol. 185, no. 7, pp. 1924–1934.
5. Jain N., Kalam H., Singh L., Sharma V., Kedia S., Das P., Ahuja V., Kumar D. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 3062.
6. Karaji N., Sattentau Q.J. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, pp. 1863.
7. Khan A., Mann L., Papanna R., Lyu M.A., Singh C.R., Olson S, Eissa N.T., Cirillo J., Das G., Hunter R.L., Jagannath C. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 15010.
8. Laskin D.L., Sunil V.R., Gardner C.R., Laskin J.D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2011, vol. 51, pp. 267–288.
9. Neharika J., Haroon K., Lakshyaveer S., Sharma V., Kedia S., Das P., Ahuja V., Kumar D. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, 2020, vol. 11, no. 1, pp. 3062.
10. Raghuvanshi S., Sharma P., Singh S., Kaer L.V., Das G. *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy Science of The USA*, 2010, vol. 107, no. 50, pp. 21653–21658.
11. Shirato K., Kasuga K., Sato S., Ishii H. Physiological Role of Alveolar Macrophage in Acute Lower Respiratory Tract Infection: Phagocytosis and Aging. Phagocytosis – Main Key of Immune System (Working Title). *IntechOpen*, 2023, pp. 23.
12. Skrahin A., Ahmed R.K., Ferrara G., Rane L., Poiret T., Isaikina Y., Skrahina A., Zumla A., Maeurer M.J. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. *Lancet Respir. Med.*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 108–122.
13. Stamm C.E., Collins A.C., Shiloh M.U. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. *Immunological Reviews*, 2015, vol. 264, no. 1, pp. 204–219.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

ФБГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» МЗ РФ
630040, Новосибирск, ул. Охотская, д. 81А
Тел: +7 (383) 203-83-58

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute,
Russian Ministry of Health
81a, Okhotskaya St., Novosibirsk, 630040
Phone: +7 (383) 203-83-58

Белгородцев Сергей Николаевич
К.м.н., ведущий научный сотрудник
лабораторно-экспериментального отдела
E-mail: s.belgorodtsev@mail.ru
ORCID: 0000-0002-3481-3793

Sergey N. Belgorodtsev
Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher
of Laboratory Experimental Department
Email: s.belgorodtsev@mail.ru
ORCID: 0000-0002-3481-3793

Лыков Александр Петрович

*К.м.н., старший научный сотрудник
лабораторно-экспериментального отдела
E-mail: aplykov2@mail.ru
ORCID: 0000-0003-4897-8676*

Немкова Елизавета Кирилловна

*Младший научный сотрудник
лабораторно-экспериментального отдела
E-mail: elizaveta.nemkova@mail.ru
ORCID: 0000-0003-2724-9546*

Шварц Яков Шмульевич

*Д.м.н., заместитель директора по научной работе
E-mail: yshschwartz@mail.ru
ORCID: 0000-0002-3036-9795*

Aleksandr P. Lykov

*Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher
of Laboratory Experimental Department
Email: aplykov2@mail.ru
ORCID: 0000-0003-4897-8676*

Elizaveta K. Nemkova

*Junior Researcher of Children
and Adolescents Department
Email: elizaveta.nemkova@mail.ru
ORCID: 0000-0003-2724-9546*

Yakov Sh. Schwartz

*Doctor of Medical Sciences, Deputy Director for Research
Email: yshschwartz@mail.ru
ORCID: 0000-0002-3036-9795*

Поступила 10.07.2023

Submitted as of 10.07.2023