

УДК 616-002-008.953-092:613.84:577.29

DOI: 10.36604/1998-5029-2023-88-17-26

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ БОЛЬНЫХ ХОБЛ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

И.Ю.Сугайло, Д.Е.Наумов, Д.А.Гассан, О.О.Котова, Я.Г.Горчакова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ. Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – тяжелое прогрессирующее заболевание, характеризующееся необратимой обструкцией дыхательных путей и эмфиземой. Длительное воздействие ингаляционных токсикантов запускает необратимые процессы, приводящие к aberrантной поляризации макрофагов и дефектному фагоцитозу, нарушению баланса про- и противовоспалительных цитокинов. **Цель.** Изучить особенности ответа макрофагов больных ХОБЛ на действие про- и противовоспалительных стимулов. **Материалы и методы.** В исследование было включено 8 больных ХОБЛ и 6 лиц контрольной группы. Всем лицам выполняли клиничко-функциональное обследование и забор периферической венозной крови для получения моноцитов. Клетки культивировали в присутствии 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в течение 6 суток, а затем проводили поляризацию полученных недифференцированных M0 макрофагов в провоспалительные (M1) и противовоспалительные (M2), добавляя липополисахариды *E. coli* (LPS) 100 нг/мл и рекомбинантный человеческий интерферон гамма (IFN- γ) 20 нг/мл, либо интерлейкин 4 (IL-4) 20 нг/мл, соответственно. Анализ цитокинов выполняли в супернатанте культуральной среды методом мультиплексного анализа на проточном цитометре. **Результаты.** В неполяризованном состоянии (M0) клетки больных ХОБЛ и лиц контрольной группы не отличались по уровню продукции цитокинов. При этом в присутствии LPS/IFN- γ у больных ХОБЛ отмечалось более выраженное увеличение концентрации провоспалительного CXCL10 по сравнению с контрольной группой (в 104,5 раз против 41,6 раз, $p=0,04$), а в группе контроля, напротив, в большей степени возрастала продукция противовоспалительного IL-10 (в 99,6 раз против 30,5 раз, $p=0,06$). Действие IL-4 на клетки больных ХОБЛ сопровождалось более заметным снижением IL-6, TNF- α , IL-8 по сравнению с группой здоровых лиц. **Заключение.** Макрофаги больных ХОБЛ характеризуются повышенной чувствительностью к поляризующим стимулам: при M1 стимуляции отмечается повышенная провоспалительная активность, а в условиях M2 дифференцировки, напротив, происходит более активное торможение продукции ряда провоспалительных медиаторов.

Ключевые слова: ХОБЛ, макрофаги, поляризация, цитокины.

PRO-INFLAMMATORY ACTIVITY OF COPD MACROPHAGES IN THE *IN VITRO* EXPERIMENT

I.Yu.Sugaylo, D.E.Naumov, D.A.Gassan, O.O.Kotova, Y.G.Gorchakova

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a severe, progressive disease characterized by irreversible airway obstruction and emphysema. Prolonged exposition to airborne toxicants triggers irreversible processes leading to aberrant polarization of macrophages and defective phagocytosis, imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Aim.** To study the features of the reaction of macrophages in COPD patients to the action of pro- and anti-inflammatory stimuli. **Materials and methods.** The study included 8 COPD patients and 6 control subjects. All per-

Контактная информация

Денис Евгеньевич Наумов, канд. мед. наук, зав. лабораторией, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: denn1985@bk.ru

Correspondence should be addressed to

Denis E. Naumov, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: denn1985@bk.ru

Для цитирования:

Сугайло И.Ю., Наумов Д.Е., Гассан Д.А., Котова О.О., Горчакова Я.Г. Провоспалительная активность макрофагов больных ХОБЛ в эксперименте *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2023. Вып.88. С.17–26. DOI: 10.36604/1998-5029-2023-88-17-26

For citation:

Sugaylo I.Yu., Naumov D.E., Gassan D.A., Kotova O.O., Gorchakova Y.G. Pro-inflammatory activity of COPD macrophages in the *in vitro* experiment. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2023; (88):17–26 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2023-88-17-26

sons underwent clinical and functional examination and sampling of peripheral venous blood for the isolation of monocytes. Cells had been cultured with 50 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for 6 days, and then were polarized into pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages by adding *E. coli* lipopolysaccharides (LPS) 100 ng/mL and recombinant human interferon gamma (IFN- γ) 20 ng/ml, or interleukin 4 (IL-4) 20 ng/ml, respectively. Cytokine analysis was performed in the culture medium supernatant by multiplex analysis on a flow cytometer. **Results.** In the non-polarized state (M0), cells of COPD patients and the control group did not differ in the rate of cytokine production. At the same time, under LPS/IFN- γ stimulation a more pronounced increase in pro-inflammatory CXCL10 was observed in patients with COPD as compared with the control group (104.5-fold vs. 41.6-fold, $p=0.04$), and in the control group, on the contrary, the production of anti-inflammatory IL-10 was increased to a greater extent (99.6-fold vs. 30.5-fold, $p=0.06$). The effect of IL-4 on COPD macrophages was accompanied by a more pronounced decrease in IL-6, TNF- α and IL-8 as compared to the group of healthy subjects. **Conclusion.** COPD macrophages are characterized by increased sensitivity to polarizing stimuli: under M1 stimulation we observed increased pro-inflammatory activity and under conditions of M2 differentiation, on the contrary, more pronounced inhibition of pro-inflammatory mediators occurred.

Key words: COPD, macrophages, polarization, cytokines.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – прогрессирующее заболевание, поражающее не только дыхательные пути, но и легочную паренхиму, приводя к обструкции дыхательных путей и эмфиземе. ХОБЛ развивается на фоне индивидуальных генетических особенностей человека в сочетании с факторами риска, основными из которых являются табакокурение и воздействие аэрополлютантов. Появление новых систем доставки никотина (электронные сигареты) и миф об их относительной безопасности приводят к дополнительному росту пагубной привычки среди населения. Исследования указывают на прямую связь между использованием электронных сигарет и возникновением ХОБЛ у курильщиков [1]. Кроме того, известно, что токсическое влияние на эпителий дыхательных путей электронных и обычных сигарет сопоставимо [2]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения девять из десяти жителей нашей планеты вынуждены дышать загрязненным воздухом. Значительно ухудшают качество воздуха лесные пожары, содержащие ядовитые газы и пылевые частицы (частицы PM_{2,5} и PM₁₀, оксиды азота, окись углерода и другие токсичные газы). Доказано, что увеличение содержания PM_{2,5} более чем на 20 мкг/м³ увеличивает смертность от всех причин на 5,6%, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний на 4,5% и смертность от респираторных заболеваний на 6,1% [3]. Сочетание факторов риска приводит к прогрессирующей утрате функции легких, а само заболевание редко протекает изолировано [4].

В основе ХОБЛ лежат хроническое воспаление и окислительный стресс. Центральным звеном этих процессов являются макрофаги, представляющие собой ключевые клетки врожденного иммунитета, отличающиеся высокой пластичностью и гетерогенностью по фенотипу и функциям, что позволяет им адаптироваться к изменениям окружающей среды. Номенклатура макрофагов впервые была предложена C.D. Mills et al. в 2000 году и широко применяется для определения подмножеств данных клеток [5]. Макрофаги M1, известные как классически активированные макрофаги, образуются из недифференцированных M0 кле-

ток под действием провоспалительного окружения (липолисахариды (LPS) клеточной стенки бактерий, интерферон-гамма (IFN- γ) и др.), секретируют активные формы кислорода, широкий спектр провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α (TNF- α), моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), CXCL8-10, интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-12). На ранней стадии воспаления данные макрофаги поглощают чужеродные патогены, удаляют бактерии и клеточный дебрис. Однако чрезмерная секреция провоспалительных цитокинов может приводить к повреждению тканей и хронизации воспаления [6]. Тем не менее, как правило, этого не происходит благодаря появлению M2 макрофагов, также называемых альтернативно активированными. Они дифференцируются из M0 клеток под действием IL-4, IL-13, иммунных комплексов, секретируют высокие уровни IL-10, TGF- β , CCL16 и CCL18 и играют критическую роль в противовоспалительных и иммуномодулирующих процессах, участвуя в разрешении воспаления и ремоделировании тканей.

Длительное воздействие ингаляционных токсикантов запускает необратимые процессы, приводящие к aberrантной поляризации макрофагов и дефектному фагоцитозу, активации и высвобождению большого количества предварительно сформированных (например, алармины: IL-33, IL-25) и синтезированных *de novo* цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6, CXCL8), что приводит к каскаду сигнальных событий, хроническому воспалению легких, обструкции дыхательных путей и разрушению альвеолярной стенки у восприимчивых лиц. Вопрос об особенностях поляризации макрофагов у больных ХОБЛ остается открытым, поскольку исследователи используют в своих экспериментах различные маркеры и разнообразные условия культивирования [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей ответа макрофагов больных ХОБЛ на действие про- и противовоспалительных стимулов *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили в соответствии с принци-

пами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом МЗ РФ №200н от 01.04.2016. Все лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания».

В исследование вошли 8 пациентов с установленным диагнозом ХОБЛ (GOLD II-IV), а также 6 здоровых добровольцев с нормальными спирометрическими показателями, некурящих и не имевших в анамнезе бронхолегочных заболеваний (контрольная группа). Всем испытуемым было проведено клинико-функциональное обследование и подсчитан индекс курения (ИК). Функцию внешнего дыхания оценивали методом спирометрии на аппарате Easy on-PC (niddMedizintechnik AG, Швейцария) исходно и после ингаляции бронхолитика. Фиксировали следующие показатели: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), отношение ОФВ₁ к ФЖЕЛ (ОФВ₁/ФЖЕЛ), пиковая объемная скорость выдоха (ПОС), мгновенные объемные скорости выдоха на уровне 25% (МОС₂₅), 50% (МОС₅₀), 75% (МОС₇₅) ФЖЕЛ, средняя объемная скорость выдоха на уровне 25-75% ФЖЕЛ (СОС₂₅₋₇₅).

Включенным в исследование лицам проводили забор венозной крови в пробирки с антикоагулянтом. Мононуклеары получали центрифугированием лейкоцитов на градиенте фикола (ООО «Биолот», Россия) при 400g в течение 40 минут. Фракцию моноцитов обогащали методом адгезии к пластику, выдерживая клетки в культуральных флаконах 2 часа при 37°C в 5 мл среды RPMI-1640. После завершения инкубации клетки трижды промывали для удаления лимфоцитов, а адгезированные моноциты культивировали в RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина и 50 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в течение 6 суток. На 6 сутки проводили поляризацию полученных недифференцированных M0 макрофагов в провоспалительные M1 и противовоспалительные M2 макрофаги, добавляя к клеткам липополисахариды *E. coli* (LPS) 100 нг/мл + рекомбинантный человеческий IFN- γ 20 нг/мл, либо интерлейкин 4 (IL-4) 20 нг/мл, соответственно. В контрольной лунке клеткам не добавляли стимулирующие факторы. Через сутки супернатант культуральной среды отбирали в пробирки и замораживали при -80°C. Концентрацию цитокинов IL4, IL2, CXCL10, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, IL-8, TGF- β 1 измеряли (в пг/мл) с помощью мультиплексного

анализа на проточном цитометре FACSCanto II (BD, США), используя набор LEGENDplex™ HU Essential Immune Response Panel (13-plex) (BioLegend, США) в соответствии с инструкцией производителя. Используя полученные значения концентраций, для состояний поляризации M1 и M2 дополнительно рассчитывали кратность изменений в продукции цитокинов по сравнению с M0 макрофагами.

Статистические расчеты выполняли в программном пакете Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные представлены в формате Me [Q₁; Q₃] – медиана и межквартильный интервал. Оценку значимости межгрупповых различий для количественных переменных выполняли с помощью критерия U Манна-Уитни. В качестве критического уровня значимости принимали значение 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Краткая сравнительная характеристика обследуемых групп по основным клинико-функциональным параметрам приведена в таблице 1. В группе больных ХОБЛ все испытуемые были мужского пола, среднего и пожилого возраста, курильщики, у подавляющего большинства отмечалась средняя и тяжелая степень заболевания (50 и 33%, соответственно), о чем свидетельствовали спирометрические показатели.

При сравнении уровней продукции цитокинов под действием LPS/IFN- γ (M1) с исходными концентрациями (M0) у больных ХОБЛ выявлялось статистически значимое увеличение IL-4 ($p=0,03$), CXCL10 ($p=0,03$), IL-1 β ($p=0,03$), TNF- α ($p=0,03$), IL-6 ($p=0,03$), IL-10 ($p=0,03$), IL-12p70 ($p=0,03$), TGF- β 1 ($p=0,03$), а также тенденция к снижению IL-8 ($p=0,08$). В противовоспалительных условиях (M2) в группе ХОБЛ происходило снижение концентрации MCP-1 ($p=0,03$) и IL-6 ($p=0,04$), но прирост продукции IFN- γ ($p=0,03$) и IL-12p70 ($p=0,03$) (табл. 2).

В контрольной группе в провоспалительных условиях так же, как и при ХОБЛ наблюдался значимый прирост IL-4 ($p=0,03$), CXCL10 ($p=0,03$), IL-1 β ($p=0,03$), TNF- α ($p=0,03$), IL-6 ($p=0,03$), IL-10 ($p=0,03$), IL-12p70 ($p=0,03$), TGF- β 1 ($p=0,03$), однако тенденция к снижению IL-8 отсутствовала. Под действием IL-4 в группе контроля обращало на себя внимание снижение MCP-1 ($p=0,04$) и возрастание концентрации IL-10 ($p=0,03$), IL-12p70 ($p=0,03$), TGF- β 1 ($p=0,04$) (табл. 3).

В неполяризованном состоянии, а также в условиях M1 поляризации макрофаги больных ХОБЛ и здоровых лиц не демонстрировали отличий в уровне продукции изучаемых медиаторов, при этом на фоне действия IL-4 уровень IL-12p70 был значимо выше в группе контроля ($p=0,03$).

При сравнении кратности изменений продукции цитокинов макрофагами в ответ на LPS/IFN- γ у больных ХОБЛ отмечался более существенный прирост CXCL10, но сниженная реакция IL-10 по сравнению с контрольной группой (табл. 4). Кратность прироста

TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70 также была несколько выше у больных ХОБЛ, однако различия были незначимы. При стимуляции макрофагов IL-4 (табл. 5) у

больных ХОБЛ в сравнении с контролем в большей степени было заметно снижение IL-6, IL-8 и TNF- α .

Таблица 1

Сравнительная клиничко-функциональная характеристика больных ХОБЛ и лиц контрольной группы

Параметр		ХОБЛ	Контроль	p-значение
Пол, м/ж, %		100/0	67/33	0,02
Возраст, лет		58 [56; 65]	47 [45; 48]	0,008
Тяжесть ХОБЛ	GOLD II	50,00%	-	-
	GOLD III	33,33%		
	GOLD IV	16,67%		
ИК, пачка-лет		40 [20;50]	-	-
ФЖЕЛ, % долж.		58,6 [52,0; 64,0]	107,0 [86,0; 120,0]	0,05
ЖЕЛ, % долж.		73,0 [53,0; 80,5]	108,0 [87,0; 121,0]	0,04
ОФВ ₁ , % долж.		30,8 [29,0; 44,0]	104,0 [91,0; 108,0]	0,03
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %		36,4 [33,6; 43,8]	90,0 [74,1; 110,0]	0,03
МОС ₅₀ , % долж.		9,4 [7,0; 14,0]	79,5 [75,0; 80,0]	0,03
МОС ₇₅ , % долж.		12,1 [4,7; 17,0]	87,8 [86,0; 94,0]	0,03
МОС ₂₅₋₇₅ , % долж.		9,0 [8,0; 17,0]	82,0 [81,0; 85,6]	<0,001
ПОС, % долж.		37,4 [28,0; 51,0]	89,9 [89,0; 93,0]	0,03

Таблица 2

Концентрации цитокинов (пг/мл) у больных ХОБЛ исходно (M0), в ответ на про- (M1) и противовоспалительные (M2) стимулы

Цитокин	M0	M1	M2
IL-4	3,5 [2,6; 4,0]	4,8 [4,4; 5,5]	-
IL-2	27,1 [26,5; 27,7]	26,7 [23,6; 26,9]	28,1 [26,0; 28,6]
CXCL10	59,5 [27,9; 124,2]	8898,0 [2996,6; 9392,5]	67,33 [36,6; 132,9]
IL-1 β	22,3 [18,7; 38,0]	49,5 [38,4; 209,1]	23,2 [17,6; 32,7]
TNF- α	47,5 [14,2; 118,8]	6899,0 [2433,7; 10917,1]	33,8 [18,0; 45,8]
MCP-1	7861,1 [3615,8; 10041,6]	8818,5 [8316,2; 9267,6]	4785,1 [896,0; 8873,2]
IL-6	2126,1 [304,6; 3954,0]	16221,0 [16221,0; 16221,0]	1428,0 [314,7; 2688,5]
IL-10	5,7 [3,0; 9,2]	86,5 [26,0; 524,3]	9,3 [4,1; 13,6]
IFN- γ	1,8 [1,3; 3,4]	-	3,7 [2,8; 5,7]
IL-12p70	0,9 [0,8; 1,3]	5,5 [2,0; 9,9]	1,2 [1,1; 1,4]
IL-8	5988,9 [5586,2; 6120,0]	5293,2 [4414,2; 5776,4]	5509,6 [5222,7; 5833,4]
TGF- β 1	28,3 [22,5; 32,3]	40,6 [32,8; 48,9]	28,6 [20,9; 34,8]

Таблица 3

**Концентрации цитокинов (пг/мл) в контрольной группе исходно (M0), в ответ на про- (M1) и
противовоспалительные (M2) стимулы**

Цитокин	M0	M1	M2
IL-4	3,0 [2,0;4,3]	4,8 [4,7; 5,0]	-
IL-2	26,7 [25,1; 27,1]	27,4 [24,1; 30,2]	28,1 [26,0; 28,6]
CXCL10	93,8 [6,3; 149,4]	3739,6 [33,5; 8289,3]	92,8 [3,9; 132,3]
IL-1 β	30,8 [22,4; 58,3]	62,25 [50,9; 85,1]	32,3 [24,8; 60,2]
TNF- α	63,2 [37,9; 87,3]	8556,4 [4113,9; 11334,5]	63,3 [51,2; 117,1]
MCP-1	7052,0 [2702,5; 9548,4]	9736,5 [9211,1; 9793,5]	3887,3 [2081,9; 9606,0]
IL-6	2896,3 [1649,4; 3882,5]	16221,0 [16221,0; 16221,0]	3142,9 [1293,0; 4617,0]
IL-10	4,6 [3,6; 5,5]	355,3 [79,8; 751,2]	7,7 [4,1; 8,4]
IFN- γ	2,2 [1,4; 37,9]	-	6,0 [4,2; 47,8]
IL-12p70	1,1 [0,9; 1,7]	3,6 [3,2; 4,3]	1,5 [1,5; 2,1]
IL-8	5391,2 [4706,0; 6153,8]	5149,8 [5081,6; 5460,6]	5759,6 [5554,1; 6474,1]
TGF- β 1	27,0 [24,1; 37,7]	41,9 [36,8; 46,3]	36,5 [31,1; 36,8]

Таблица 4

**Кратность изменения концентрации цитокинов при стимуляции макрофагов LPS/IFN- γ у больных
ХОБЛ и у здоровых лиц**

Цитокин	ХОБЛ	Контроль	p-значение
IL-4	1,58 [1,31; 1,89]	1,66 [1,24; 2,35]	0,9
IL-2	0,96 [0,87; 0,99]	0,97 [0,95; 1,10]	0,2
CXCL10	104,4 [51,3; 187,4]	41,6 [8,1; 55,5]	0,04
IL-1 β	2,52 [1,83; 5,51]	1,80 [1,46; 2,13]	0,2
TNF- α	161,6 [56,5; 397,4]	130,8 [82,5; 272,3]	0,7
MCP-1	1,25 [0,83; 2,78]	1,47 [0,97; 3,73]	0,5
IL-6	14,2 [4,1; 47,2]	6,2 [4,2; 9,8]	0,5
IL-10	30,5 [8,5; 42,7]	99,6 [71,2; 135,8]	0,06
IFN- γ	-	-	-
IL-12p70	5,40 [2,37; 10,19]	3,49 [2,14; 3,99]	0,4
IL-8	0,89 [0,72; 0,98]	0,96 [0,88; 1,04]	0,3
TGF- β 1	1,50 [1,46; 1,64]	1,41 [0,23; 1,59]	0,5

Таблица 5

Кратность изменения концентрации цитокинов при стимуляции макрофагов IL-4 у больных ХОБЛ и у здоровых лиц

Цитокин	ХОБЛ	Контроль	p-значение
IL-4	-	-	-
IL-2	1,03 [0,96; 1,08]	1,13 [1,02; 1,22]	0,2
CXCL10	1,07 [0,94; 1,31]	0,92 [0,89; 1,06]	0,2
IL-1 β	0,90 [0,82; 0,98]	1,05 [0,90; 1,15]	0,2
TNF- α	0,81 [0,52; 1,20]	1,32 [1,20; 1,87]	0,09
MCP-1	0,68 [0,29; 0,88]	0,70 [0,52; 0,82]	0,8
IL-6	0,73 [0,63; 0,91]	1,07 [0,84; 1,35]	0,04
IL-10	1,32 [1,27; 1,66]	1,50 [1,10; 2,06]	0,7
IFN- γ	2,19 [1,66; 2,28]	2,45 [1,26; 3,03]	0,6
IL-12p70	1,32 [1,15; 1,38]	1,39 [1,22; 1,62]	0,5
IL-8	0,94 [0,88; 1,01]	1,16 [1,02; 1,24]	0,06
TGF- β 1	1,04 [0,96; 1,11]	1,16 [1,06; 1,27]	0,3

Мы исследовали особенности ответа макрофагов на действие M1 и M2 поляризующих стимулов и выявили, что в клетках здоровых лиц и больных ХОБЛ в целом прослеживаются схожие закономерности, но, тем не менее, были выявлены и отличия. Так, несмотря на отсутствие исходных различий в продукции цитокинов, макрофаги больных ХОБЛ отличались большим нарастанием секреции CXCL10, но сниженной интенсивностью образования IL-10 в ответ на действие LPS/IFN- γ . CXCL10, также известный как IFN- γ индуцируемый белок массой 10 кДа – хемокин, секретируемый многими лейкоцитами и клетками эпителия, который, главным образом, служит фактором хемотаксиса для макрофагов, дендритных клеток, NK клеток и Т лимфоцитов, хотя также вовлечен в регуляцию клеточной пролиферации, апоптоза и ангиогенез [7]. Данные о роли CXCL10 при ХОБЛ немногочисленны, но указывают на важную роль этого хемокина в патогенезе заболевания. В единственном экспериментальном исследовании блокирование активности CXCL10 антителами предотвращало нарастание бронхиальной обструкции и воспаления в дыхательных путях у мышей, подвергнутых воздействию сигаретного дыма. Аналогичный эффект отмечался на клеточной линии эпителия 16HBE: антитела к CXCL10 значимо снижали продукцию IL-6 и MCP-1 в ответ на действие 2% экстракта сигаретного дыма [8]. В свою очередь, IL-10 – противовоспалительный цитокин, уровни которого, как правило, снижены у больных ХОБЛ. Обнаружено, что концентрация IL-10 в мокроте больных ХОБЛ ниже, чем у больных бронхиальной астмой, курильщи-

ков без бронхиальной обструкции и здоровых некурящих лиц [9]. Кроме того, известно, что продукция IL-10 падает с увеличением степени тяжести заболевания [10]. В исследовании J.M. Tebo et al. были установлены антагонистические взаимоотношения между CXCL10 и IL-10. Так, IL-10 угнетал LPS-индуцированную продукцию CXCL10, снижая транскрипцию соответствующего гена, однако не оказывал влияния на образование CXCL10 под действием IFN- γ или IFN- β [11]. Таким образом, действуя ауто- и паракринно, IL-10 вероятно блокирует синтез интерферонов в макрофагах в условиях провоспалительной стимуляции LPS, что, в свою очередь, угнетает CXCL10. Первичная недостаточность LPS-индуцированного нарастания экспрессии IL-10 в макрофагах при ХОБЛ может быть обусловлена низкими уровнями циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что, как известно, характерно для ХОБЛ и вызвано повышенной активностью в клетках фосфодиэстеразы 4 [12]. С другой стороны, роль может играть снижение экспрессии транскрипционного фактора Sp1, характерное для условий хронического воздействия сигаретного дыма [13]. При этом O. Ernst et al. было установлено, что цАМФ и Sp1 имеют критическое значение для продукции IL-10 в ранней и поздней фазе стимуляции клеток LPS [14]. Необходимо подчеркнуть, что, несмотря на повышенную провоспалительную активность, макрофаги больных ХОБЛ демонстрируют дефектный фагоцитоз и не способны полностью элиминировать бактериальные патогены, персистирующие в дыхательных путях. При этом сниженный фагоцитоз *H. influenzae* ассоциирован

с более высокой частотой обострений заболевания, а значит и с его прогрессированием [15].

M2 поляризация макрофагов в нашем эксперименте позволила установить, что действие IL-4 сопровождается более выраженным снижением продукции ряда провоспалительных цитокинов клетками больных ХОБЛ по сравнению с группой контроля. Тем не менее, клиническая релевантность данного наблюдения остается под вопросом. Известно, что для ХОБЛ в большей степени характерно Th1- и Th17-воспаление. Так, среди больных ХОБЛ с легким течением заболевания Th1-воспаление было определено у 67%, а Th17 – у 33%. При этом по мере увеличения степени тяжести ХОБЛ доля Th17-воспаления начинала преобладать (54 и 75% у больных с тяжелой и крайне тяжелой ХОБЛ, соответственно) [16]. Th2 вариант воспаления с повышенными уровнями IL-4 является типичным для больных аллергической бронхиальной астмой, а также может обнаруживаться у лиц с оверлап-синдромом бронхиальной астмы и ХОБЛ [17]. В то же время, при ХОБЛ продукция IL-4, как правило, невысокая. К примеру, в лейкоцитах больных ХОБЛ было выявлено достоверное снижение стимулированной экспрессии IL-4 по сравнению со здоровыми лицами, однако после лечения продукция IL-4 увеличивалась [18]. В более поздней работе показатели базальной и индуцированной экспрессии IL-4 в клетках больных ХОБЛ и здоровых лиц не демонстрировали отличий [19]. Исследование уровня IL-4 в сыворотке больных лиц также установило, что концентрация данного интерлейкина была ниже референсного значения [16].

Выводы

Полученные результаты впервые демонстрируют

особенности реакции макрофагов, полученных из моноцитов больных ХОБЛ, на про- и противовоспалительные поляризующие факторы *in vitro*. Установлено, что клетки больных ХОБЛ отличаются повышенной чувствительностью как к стимуляции LPS/IFN- γ , так и IL-4. В первом случае макрофаги характеризовались выраженным нарастанием уровня CXCL10 на фоне дефицита продукции IL-10, во втором – снижением экспрессии IL-6, IL-8 и TNF- α . Свидетельства о провоспалительной активности макрофагов при ХОБЛ встречались и ранее, однако результаты настоящего исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения роли CXCL10 в патогенезе заболевания, в том числе, уточнения его возможных ассоциаций с фенотипом, тяжестью и скоростью прогрессирования ХОБЛ. С другой стороны, может оказаться полезным изучение путей, активирующих сигналинг IL-4 и IL-10, поскольку данные цитокины обладают не только противовоспалительным эффектом, но и способствуют улучшению фагоцитарного потенциала клеток [20], что должно благоприятствовать элиминации микроорганизмов и апоптотических клеток из дыхательных путей и стиханию воспалительной реакции.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Источники финансирования

Исследование проводилось без участия спонсоров.

Funding Sources

This study was not sponsored

ЛИТЕРАТУРА

1. Antwi G.O., Rhodes D.L. Association between E-cigarette use and chronic obstructive pulmonary disease in non-asthmatic adults in the USA // J. Public Health. 2022. Vol.44, Iss.1, P.158–164. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdaa229>
2. O'Farrell H.E., Brown R., Brown Z., Miljevic B., Ristovski Z.D., Bowman R.V., Fong K.M., Vaughan A., Yang I.A. E-cigarettes induce toxicity comparable to tobacco cigarettes in airway epithelium from patients with COPD // Toxicol. in Vitro. 2021. Vol.75. Article number: 105204. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105204>
3. Walter C.M., Schneider-Futschik E.K., Knibbs L.D., Irving L.B. Health impacts of bushfire smoke exposure in Australia // Respirology. 2020. Vol.25, Iss.5. P.495–501. <https://doi.org/10.1111/resp.13798>
4. Gould G.S., Hurst J.R., Trofor A., Alison J.A., Fox G., Kulkarni M.M., Wheelock C.E., Clarke M., Kumar R. Recognising the importance of chronic lung disease: a consensus statement from the Global Alliance for Chronic Diseases (Lung Diseases group) // Respir. Res. 2023. Vol.24, Iss.1. Article number: 15. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02297-y>
5. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // J. Immunol. 2000. Vol.164, Iss.12. P.6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
6. Deng L., Jian Z., Xu T., Li F., Deng H., Zhou Y., Lai S., Xu Z., Zhu L. Macrophage Polarization: An Important Candidate Regulator for Lung Diseases // Molecules. 2023. Vol.28, Iss.5. Article number: 2379. <https://doi.org/10.3390/molecules28052379>
7. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., Jain V., Singh N., Wilson N.O., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications // Cytokine Growth Factor Rev. 2011. Vol.22, Iss.3. P.121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
8. Jing H., Liu L., Zhou J., Yao H. Inhibition of C-X-C Motif Chemokine 10 (CXCL10) Protects Mice from Cigarette

Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Med. Sci. Monit.* 2018. Vol.24. P.5748–5753. <https://doi.org/10.12659/MSM.909864>

9. Takanashi S., Hasegawa Y., Kanehira Y., Yamamoto K., Fujimoto K., Satoh K., Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers // *Eur. Respir. J.* 1999. Vol.14, Iss.2. P.309–314. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b12.x>

10. Silva B.S.A., Lira F.S., Ramos D., Uzeloto J.S., Rossi F.E., Freire A.P.C.F., Silva R.N., Trevisan I.B., Gobbo L.A., Ramos E.M.C. Severity of COPD and its relationship with IL-10 // *Cytokine*. 2018. Vol.106. P.95–100. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.018>

11. Tebo J.M., Kim H.S., Gao J., Armstrong D.A., Hamilton T.A. Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon // *Blood*. 1998. Vol.92, Iss.12. P.4742–4749. PMID: 9845540.

12. Nourian Y.H., Salimian J., Ahmadi A., Salehi Z., Karimi M., Emamvirdizadeh A., Azimzadeh Jamalkandi S., Ghanei M. cAMP-PDE signaling in COPD: Review of cellular, molecular and clinical features // *Biochem. Biophys. Rep.* 2023. Vol.34. Article number: 101438. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101438>

13. Wu H., Ma H., Wang L., Zhang H., Lu L., Xiao T., Cheng C., Wang P., Yang Y., Wu M., Wang S., Zhang J., Liu Q. Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1 α // *Int. J. Biol. Sci.* 2022. Vol.18, Iss.2. P.661–674. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65861>

14. Ernst O., Glucksam-Galnoy Y., Bhatta B., Athamna M., Ben-Dror I., Glick Y., Gerber D., Zor T. Exclusive Temporal Stimulation of IL-10 Expression in LPS-Stimulated Mouse Macrophages by cAMP Inducers and Type I Interferons // *Front. Immunol.* 2019. Vol.10. Article number: 1788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01788>

15. Singh R., Belchamber K.B.R., Fenwick P.S., Chana K., Donaldson G., Wedzicha J.A., Barnes P.J., Donnelly L.E.; COPDMap consortium. Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD // *Respir. Res.* 2021. Vol.22, Iss.1. Article number: 113. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01718-8>

16. Виткина Т.И., Денисенко Ю.К., Давыдова К.А. Изменение профиля цитокинов при прогрессировании хронической обструктивной болезни легких // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016. №7-3(49). С.6–8. EDN: WEYKKT. <https://doi.org/10.18454/IRJ.2016.49.024>

17. Dey S., Eapen M.S., Chia C., Gaikwad A.V., Wark P.A.B., Sohal S.S. Pathogenesis, clinical features of asthma COPD overlap, and therapeutic modalities // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2022. Vol.322, Iss.1. P.L64–L83. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00121.2021>

18. Абдурахманова И.С., Никуличева В.И., Вагапова Д.Р., Еникеев О.А. Характер экспрессии провоспалительных цитокинов у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2010. №2. С.314–317. EDN: MWJMJZ.

19. Трушина Е.Ю., Костина Е.М., Молотиллов Б.А., Типикин В.А., Баранова Н.И. Роль цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в иммунопатогенезе хронической обструктивной болезни легких // *Медицинская иммунология*. 2019. Т.21, №1. С.89–98. EDN: YXR XVZ. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-89-98>

20. Yi S., Jiang X., Tang X., Li Y., Xiao C., Zhang J., Zhou T. IL-4 and IL-10 promotes phagocytic activity of microglia by up-regulation of TREM2 // *Cytotechnology*. 2020. Vol.72, Iss.4. P.589–602. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00409-4>

REFERENCES

1. Antwi G.O., Rhodes D.L. Association between E-cigarette use and chronic obstructive pulmonary disease in non-asthmatic adults in the USA. *J. Public Health*. 2022; 44(1):158–164. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdaa229>

2. O'Farrell H.E., Brown R., Brown Z., Miljevic B., Ristovski Z.D., Bowman R.V., Fong K.M., Vaughan A., Yang I.A. E-cigarettes induce toxicity comparable to tobacco cigarettes in airway epithelium from patients with COPD. *Toxicol. in Vitro* 2021; 75:105204. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105204>

3. Walter C.M., Schneider-Futschik E.K., Knibbs L.D., Irving L.B. Health impacts of bushfire smoke exposure in Australia. *Respirology* 2020; 25(5):495–501. <https://doi.org/10.1111/resp.13798>

4. Gould G.S., Hurst J.R., Trofor A., Alison J.A., Fox G., Kulkarni M.M., Wheelock C.E., Clarke M., Kumar R. Recognising the importance of chronic lung disease: a consensus statement from the Global Alliance for Chronic Diseases (Lung Diseases group). *Respir. Res.* 2023; 24(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02297-y>

5. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000; 164(12):6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>

6. Deng L., Jian Z., Xu T., Li F., Deng H., Zhou Y., Lai S., Xu Z., Zhu L. Macrophage Polarization: An Important Candidate Regulator for Lung Diseases. *Molecules* 2023; 28(5):2379. <https://doi.org/10.3390/molecules28052379>

7. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., Jain V., Singh N., Wilson N.O., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011; 22(3):121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>

8. Jing H., Liu L., Zhou J., Yao H. Inhibition of C-X-C Motif Chemokine 10 (CXCL10) Protects Mice from Cigarette

Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Med. Sci. Monit.* 2018; 24:5748–5753. <https://doi.org/10.12659/MSM.909864>

9. Takanashi S., Hasegawa Y., Kanehira Y., Yamamoto K., Fujimoto K., Satoh K., Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur. Respir. J.* 1999; 14(2):309–314. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14b12.x>

10. Silva B.S.A., Lira F.S., Ramos D., Uzeloto J.S., Rossi F.E., Freire A.P.C.F., Silva R.N., Trevisan I.B., Gobbo L.A., Ramos E.M.C. Severity of COPD and its relationship with IL-10. *Cytokine* 2018; 106:95–100. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.018>

11. Tebo J.M., Kim H.S., Gao J., Armstrong D.A., Hamilton T.A. Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon. *Blood* 1998; 92(12):4742–4749. PMID: 9845540.

12. Nourian Y.H., Salimian J., Ahmadi A., Salehi Z., Karimi M., Emamvirdizadeh A., Azimzadeh Jamalkandi S., Ghanei M. cAMP-PDE signaling in COPD: Review of cellular, molecular and clinical features. *Biochem. Biophys. Rep.* 2023; 34:101438. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101438>

13. Wu H., Ma H., Wang L., Zhang H., Lu L., Xiao T., Cheng C., Wang P., Yang Y., Wu M., Wang S., Zhang J., Liu Q. Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1α. *Int. J. Biol. Sci.* 2022; 18(2):661–674. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65861>

14. Ernst O., Glucksam-Galnoy Y., Bhatta B., Athamna M., Ben-Dror I., Glick Y., Gerber D., Zor T. Exclusive Temporal Stimulation of IL-10 Expression in LPS-Stimulated Mouse Macrophages by cAMP Inducers and Type I Interferons. *Front. Immunol.* 2019; 10:1788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01788>

15. Singh R., Belchamber K.B.R., Fenwick P.S., Chana K., Donaldson G., Wedzicha J.A., Barnes P.J., Donnelly L.E.; COPDMap consortium. Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD. *Respir. Res.* 2021; 22(1):113. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01718-8>

16. Vitkina T.I., Denisenko Yu.K., Davydova K.A. The changes in the profile of cytokines in progressing chronic obstructive pulmonary disease. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal* 2016; (7-3):6–8. <https://doi.org/10.18454/IRJ.2016.49.024>

17. Dey S., Eapen M.S., Chia C., Gaikwad A.V., Wark P.A.B., Sohal S.S. Pathogenesis, clinical features of asthma COPD overlap, and therapeutic modalities. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2022; 322(1):L64–L83. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00121.2021>

18. Abdutakhmanova I.S., Nikulicheva V.I., Vagapova D.R., Enikeev O.A. [Proinflammatory cytokine expression in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2010; (2):314–317 (in Russian).

19. Trushina E.Yu., Kostina E.M., Molotilov B.A., Tipikin V.A., Baranova N.I. [Role of IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 cytokines in the immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease]. *Medical Immunology (Russia)* 2019; 21(1):89–98 (in Russian). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-89-98>

20. Yi S., Jiang X., Tang X., Li Y., Xiao C., Zhang J., Zhou T. IL-4 and IL-10 promotes phagocytic activity of microglia by up-regulation of TREM2. *Cytotechnology* 2020; 72(4):589–602. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00409-4>

Информация об авторах:

Ивана Юрьевна Сугайло, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Денис Евгеньевич Наумов, канд. мед. наук, зав. лабораторией, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: denn1985@bk.ru

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dani-shi@mail.ru

Author information:

Ivana Yu. Sugaylo, PhD (Med.), Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Denis E. Naumov, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: denn1985@bk.ru

Dina A. Gassan, PhD (Med.), Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dani-shi@mail.ru

Олеся Олеговна Котова, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Olesya O. Kotova, PhD (Med.), Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Яна Геннадьевна Горчакова, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

Yana G. Gorchakova, Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

*Поступила 10.04.2023
Принята к печати 26.04.2023*

*Received April 10, 2023
Accepted April 26, 2023*