CC BY 4.0

https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-776
УДК 616.23/.24-002.2:616.151:612.112.95

Характеристика субпопуляций моноцитов периферической крови больных хронической обструктивной болезнью легких

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

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Дальневосточного отделения Российской академии наук (ДНЦ ФПД),
675000, Российская Федерация, Благовещенск, ул. Калинина, 22

Аннотация

Обоснование. Моноциты, являясь предшественниками макрофагов, играют важную роль в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Традиционно выделяют классические (CD14++/CD16–), промежуточные (CD14++CD16+) и неклассические (CD14+/CD16++) субпопуляции моноцитов, отличающиеся различными функциональными характеристиками.

Цель и масштаб исследования: исследовать количественное соотношение циркулирующих субпопуляций моноцитов у больных ХОБЛ, выявить их возможную взаимосвязь с показателями функции внешнего дыхания и гуморальными маркерами воспаления.

Материал и методы. Обследованы 47 больных ХОБЛ, преимущественно II–III степени тяжести по GOLD (основная группа), и 25 лиц, не имевших бронхиальной обструкции (контрольная группа). Субпопуляции моноцитов определяли методом проточной цитометрии. Концентрации цитокинов в плазме крови измеряли с помощью мультиплексного анализа на проточном цитофлуориметре. Функцию внешнего дыхания оценивали методом спирометрии.

Результаты. У больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой наблюдали сниженное количество неклассических моноцитов (10,5 (6,7–15,1)% против 14,4 (8,3–18,4)%, p = 0,04). Большее содержание классических моноцитов было ассоциировано с более выраженным снижением бронхиальной проходимости ($ОФВ_1$ ρ = –0,37; p = 0,007), тогда как для промежуточных моноцитов была характерна прямая взаимосвязь с $ОФВ_1$ (ρ = 0,42; p = 0,003). Число неклассических моноцитов в основной группе имело обратные корреляции с концентрациями цитокинов.

Заключение. Полученные результаты указывают на дефицит неклассических моноцитов у больных ХОБЛ, что может способствовать системному воспалительному ответу. В то же время классические формы моноцитов могут быть вовлечены в формирование бронхиальной обструкции.

Ключевые слова:	субпопуляции моноцитов; хроническая обструктивная болезнь легких; воспаление; цитокины; проточная цитометрия.
Финансирование:	исследование выполнено в рамках программы фундаментальных исследований Министерства науки и высшего образования РФ (FGWF-2022-0005).
Соответствие принципам этики:	исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (протокол № 140 от 16.12.2021 г.). Все участники подписывали информированное согласие на участие в исследовании.
Для цитирования:	Сугайло И.Ю., Наумов Д.Е., Котова О.О., Гассан Д.А., Горчакова Я.Г., Шелудько Е.Г. Характеристика субпопуляций моноцитов периферической крови больных хронической обструктивной болезнью легких. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2024;39(4):107–114. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-776.

Сугайло Ивана Юрьевна, ivanka_888@mail.ru

Characteristics of monocyte subpopulations in peripheral blood of the patients with chronic obstructive pulmonary disease

Ivana Yu. Sugaylo, Denis E. Naumov, Olesya O. Kotova, Dina A. Gassan, Yana G. Gorchakova, Elizaveta G. Sheludko

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

Abstract

Rationale. As the precursors of macrophages, monocytes play an important role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Traditionally, classical ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediate ($CD14^{++}CD16^{+}$) and non-classical ($CD14^{+}CD16^{++}$) subpopulations of monocytes are distinguished, which differ in their functional characteristics.

Aim: To study the relative amount of circulating subpopulations of monocytes in patients with COPD and to identify their possible relationship with pulmonary function and humoral inflammatory markers.

Methodology and Research Methods. The study enrolled 47 patients with COPD, predominantly GOLD II-III, and 25 individuals without bronchial obstruction (control group). Monocyte subpopulations were determined by flow cytometry. Plasma cytokine concentrations were measured using a multiplex assay on a flow cytometer. Pulmonary function was assessed by spirometry.

Results. A reduced number of non-classical monocytes was observed in COPD patients as compared to the control group (10.5 (6.7–15.1)% vs. 14.4 (8.3–18.4)%, $p = 0.04$). Higher content of classical monocytes was associated with a more pronounced decrease in bronchial patency (FEV_1 $\rho = -0.37$, $p = 0.007$), while intermediate monocytes were characterized by a direct relationship with FEV_1 ($\rho = 0.42$, $p = 0.003$). The number of non-classical monocytes in the main group had inverse correlations with cytokine concentrations.

Conclusion. The obtained results indicate a deficiency of non-classical monocytes in COPD patients, which may contribute to systemic inflammatory response, while classical forms of monocytes may be involved in the formation of bronchial obstruction.

Keywords:	monocytes; subpopulations; COPD; inflammation; cytokines; flow cytometry.
Funding:	the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the Program for Basic Research (FGWF-2022-0005).
Compliance with ethical standards:	All participants signed an informed consent to participate in the study.
For citation:	Sugaylo I.Yu., Naumov D.E., Kotova O.O., Gassan D.A., Gorchakova Ya.G., Sheludko E.G. Characteristics of monocyte subpopulations in peripheral blood of the patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2024;39(4):107–114. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2024-776.

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – распространенное заболевание, занимающее лидирующие позиции среди причин смертности. Текущая распространенность ХОБЛ приближается к 12%, при этом, согласно прогнозам, к 2050 г. она возрастет на 23%, а общее количество больных в мире достигнет 600 млн человек [1].

ХОБЛ рассматривается как хроническое воспалительное заболевание легких, развивающееся в ответ на воздействие аэрополлютантов и компонентов сигаретного дыма. Известно, что лишь у 10–20% длительно курящих лиц развивается ХОБЛ, что говорит о наличии индивидуальных факторов предрасположенности к заболеванию [2].

Согласно данным транскриптомного профилирования, моноциты могут играть важную роль в патогенезе ХОБЛ [3]. Известно, что ХОБЛ характеризуется хроническим системным воспалением, которое запускает петлю положительной обратной связи, активируя гемопоэтические предшественники и генерируя зрелые миелоидные клетки с повышенным воспалительным потенциалом. Таким образом, воспалительные медиаторы индуцируют изменения на уровне клеток костного мозга, которые проявляются в том числе и в моноцитах (классических, промежуточных и неклассических) и далее в макрофагах, что может отрицательно влиять на течение заболевания [4].

На основании экспрессии поверхностных молекул CD14 и CD16 выделяют 3 основные субпопуляции моноцитов, которым присущи различные функциональные особенности. При этом важно, что данные субпопуляции способны трансформироваться из одной в другую по мере созревания. Так, первичная дифференцировка моноцитов из предшественников происходит преимущественно в костном мозге под действием макрофагального колониестимулирующего фактора, в результате

чего в кровь высвобождаются классические моноциты ($CD14^{++}CD16^{-}$), где они циркулируют в течение суток. Далее большинство из них покидают кровоток и переходят в ткани либо погибают. Приблизительно 1% циркулирующих классических моноцитов дифференцируется в промежуточные ($CD14^{++}CD16^{+}$) формы, а спустя 4,3 дня вся популяция промежуточных моноцитов превращается в неклассические ($CD14^{+}CD16^{++}$) [4].

Классические моноциты преобладают в общей популяции моноцитов: у здоровых людей данная субпопуляция составляет около 85% [5]. Они несут паттерн-распознающие рецепторы, благодаря которым распознают и поглощают бактерии, липиды, апоптотические клетки, большое количество хемокиновых рецепторов, продуцируют активные формы кислорода, IL-6, IL-8, CCL-2, CCL-3, CCL-5 [4]. Оседая в тканях, классические моноциты, по-видимому, могут иметь больший потенциал трансформации в провоспалительные макрофаги, поскольку экспрессируют больше рецепторов CD116 к гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору [6]. Кроме этого, известно, что макрофаги, дифференцированные из $CD14^{++}CD16^{-}$ моноцитов в присутствии макрофагального колониестимулирующего фактора, отличаются наиболее выраженной реакцией в ответ на стимуляцию липополисахаридами, в частности, экспрессируют высокие уровни CD86, различных цитокинов, демонстрируют повышенную фагоцитарную активность [7].

Промежуточные моноциты составляют лишь 5% от общего количества, однако продуцируют множество провоспалительных цитокинов (например, TNF-α, IL-1β, IL-6, CCL3), несут на своей поверхности хемокиновые рецепторы CCR5 и CX3CR1, выступают как антигенпрезентирующие клетки [4]. Есть исследования, приписывающие данному подтипу противоопухолевые свойства [6]. J. Skrzeczyńska-Moncznik и соавт. утверждают, что данные клетки продуцируют IL-10 в ответ на активацию TLR [9]. Таким образом, истинная роль промежуточных моноцитов остается неясной. Еще предстоит уточнить, в каком соотношении и в каких условиях данные клетки продуцируют про- и противовоспалительные цитокины.

Неклассические моноциты составляют около 10%, экспрессируют высокие уровни рецепторов CX3CR1 и CD11c [4]. Данные клетки способны адгезироваться к эндотелиальным клеткам, осуществляя «патрулирование» стенок сосудов, удаляют мертвые клетки, демонстрируют FcR- и комплимент-опосредованный фагоцитоз. Они не реагируют на бактериальные сигналы, однако избирательно продуцируют провоспалительные цитокины (TNF-α, IL-1β и CCL3) в ответ на вирусные нуклеиновые кислоты и иммунные комплексы, что может указывать на важную роль неклассических моноцитов в формировании иммунного ответа на вирусные патогены, а также в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Показано, что экстравазация этого типа моноцитов в ткани сопровождается их дифференцировкой в противовоспалительный М2 фенотип макрофагов [10].

Недавние исследования показали, что нарушение соотношения субпопуляций моноцитов встречается в развитии атеросклероза, сахарного диабета, инсульта, инфаркта миокарда и при других заболеваниях, связанных с иммунным воспалением [10]. При этом работы, в которых анализировали число различных субпопуляций моноцитов в крови больных ХОБЛ, крайне малочисленны и противоречивы. Таким образом, актуальным остается дальнейшее изучение роли субпопуляций моноцитов при ХОБЛ, в том числе выявление корреляций с клиническими и молекулярными признаками заболевания, подтверждение взаимосвязи дисфункции макрофагов с нарушениями на уровне моноцитов периферической крови.

Цель исследования: изучение количественного соотношения циркулирующих субпопуляций моноцитов у больных ХОБЛ, выявление их возможной взаимосвязи с показателями функции внешнего дыхания и гуморальными маркерами воспаления.

Материал и методы

Исследование было проведено в соответствии принципами 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 № 200н от 01.04.2016 г. МЗ РФ, одобрено локальным комитетом по биомедицинской этике (протокол № 140 от 16.12.2021 г.). Все лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

На базе клинико-диагностического отделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (ДНЦ ФПД) были обследованы 47 больных ХОБЛ вне обострения и 25 лиц контрольной группы. Из исследования исключались лица, имевшие эндокринные, онкологические, инфекционные заболевания, а также прочую респираторную патологию, кроме ХОБЛ и хронического необструктивного бронхита (у курящих лиц контрольной группы). Сравнительная клиническая характеристика и показатели вентиляционной функции легких для обследованных групп отражена в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-функциональная характеристика основной и контрольной групп

Table 1. Clinical and functional characteristics of the main and control groups

Показатели	Основная группа	Контрольная группа	Значимость (p)
Возраст, лет	63,0 ± 1,42	51,0 ± 2,00	< 0,001
Пол (м/ж), %	85 / 15	100 / 0	0,045
ИК, пачка-лет	35,1 ± 2,51	18,7 ± 4,39	0,002
ИК >20 пачка-лет, n (%)	36 (76,6)	6 (24)	< 0,001
ЖЕЛ, % от должного	64 (52–76)	98 (94–108)	< 0,001
ФЖЕЛ, % от должного	66 (52–81)	101 (96–112)	< 0,001
$ОФВ_1$, % от должного	38 (28–56)	101 (85–110)	< 0,001
ИТ, %	47,6 (38,3–62,9)	78,6 (72,12–81,9)	< 0,001
ПОС, % от должного	42 (30–59)	97 (89–103)	< 0,001
$МОС_{25}$, % от должного	23 (18–42)	93 (64–107)	< 0,001
$МОС_{50}$, % от должного	15 (12–24)	84,6 (59–107)	< 0,001
$МОС_{75}$, % от должного	15 (10–23)	64 (47–92)	< 0,001
$СОС_{25–75}$, % от должного	17 (11–23)	83,4 (55,5–95,45)	< 0,001

Примечание: ИК – индекс курения, ЖЕЛ – жизненная емкость легких, ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких, $ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за 1 с, ИТ – индекс Тиффно, ПОС – пиковая объемная скорость, $МОС_{25}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 25% ФЖЕЛ, $МОС_{50}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 50% ФЖЕЛ, $МОС_{75}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 75% ФЖЕЛ, $СОС_{25–75}$ – средняя объемная скорость в диапазоне 25–75% ФЖЕЛ.

В структуре ХОБЛ преобладали пациенты со средней степенью бронхиальной обструкции, согласно классификации Глобальной инициативы по ХОБЛ (GOLD II, 52,2%). Реже встречались больные с тяжелой (GOLD III) обструкцией (32,6%); крайне тяжелое течение заболевания (GOLD IV) было зарегистрировано в 13,0% случаев, и лишь у 2,2% больных наблюдалось легкое течение ХОБЛ (GOLD I). Среди больных ХОБЛ заболевание было ассоциировано с курением в 91,5% случаев. В контрольную группу входили лица без признаков бронхиальной обструкции, из них 48% были курильщиками.

С целью оценки степени бронхиальной обструкции всем лицам выполняли спирометрическое исследование на аппарате Easy on-PC (nddMedizintechnik AG, Швейцария). При этом оценивали величины объема форсированного выдоха за 1 с ($ОФВ_1$), жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), отношение $ОФВ_1$ к жизненной емкости легких (индекс Тиффно (ИТ)), пиковую объемную скорость (ПОС), мгновенные объемные скорости выдоха на уровнях 25% ФЖЕЛ ($МОС_{25}$), 50% ФЖЕЛ ($МОС_{50}$), 75% ФЖЕЛ ($МОС_{75}$), а также среднюю объемную скорость выдоха на уровне 25–75% ФЖЕЛ ($СОС_{25–75}$).

Лабораторные исследования выполняли с привлечением оборудования Центра коллективного пользования ДНЦ ФПД. Периферическую венозную кровь отбирали в пробирку, содержащую ЭДТА, эритроциты лизировали 15 мин с буфером BD Pharm Lyse (BD Biosciences, США) и однократно отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), согласно протоколу производителя для получения суспензии лейкоцитов. К полученным лейкоцитам добавляли антитела к CD45 APC-Cy7 (Elabscience, КНР), CD14 PE-Cy7 (Elabscience, КНР), CD16 PerCP-Cy5.5 (Elabscience, КНР) и инкубировали при 4 °C в течение ночи. Методический подход с длительной инкубацией был выбран ввиду ряда преимуществ, подробно описанных в работе C.E. White и соавт. [11]. После окончания инкубации клетки отмывали в 2 мл ФСБ, ресуспендировали и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США), используя программное обеспечение FACS Diva 6.0 (Becton Dickinson, США). Лейкоциты гейтировали как $CD45^+$ клетки. Гранулоциты определяли как $CD16^{++}$ клетки с высоким боковым светорассеянием (SSC-A). Моноциты гейтировали на графиках прямого светорассеяния (FSC-A) и SSC-A. Число классических ($CD14^{++}CD16^-$), промежуточных ($CD14^{++}CD16^+$) и неклассических ($CD14^+CD16^{++}$) моноцитов определяли на графиках PE-Cy7 × PerCP-Cy5.5 и выражали в процентах от общей популяции моноцитов. Концентрации цитокинов IL-4, IL-2, CXCL-10, IL-1β, TNF-α, MCP-1, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-12p70, IL-8 в плазме крови измеряли в пикограммах на миллилитр (пг/мл) с помощью мультиплексного анализа коммерческими наборами LEGENDplex (BioLegend, США) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

Статистические расчеты выполняли в программном пакете STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc., США). Для переменных с нормальным распределением данные представлены в формате $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартная ошибка среднего. Для количественных переменных, с распределением, отличным от нормального, данные представлены в виде *Me* (*Q*1–*Q*3), где *Me* – медиана, *Q*1–*Q*3 – межквартильный диапазон. Проверку нормальности распределения переменных проводили с использованием критерия Шапиро – Уилка. Оценку значимости межгрупповых различий для нормально распределенных количественных переменных выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента, при отсутствии нормальности распределения – U-критерия Манна – Уитни. Поиск статистически значимых взаимосвязей между количественными переменными проводили с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена ρ. Ассоциации для качественных переменных в основной и контрольной группах оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. В качестве критического уровня значимости принимали значение 0,05.

Результаты

При анализе субпопуляций моноцитов у больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой было отмечено сниженное количество неклассических моноцитов, причем, судя по медианным значениям, данное снижение происходило преимущественно за счет нарастания числа классических форм, тогда как процент промежуточных моноцитов был одинаковым (табл. 2).

Таблица 2. Сравнение субпопуляций моноцитов между больными хронической обструктивной болезнью легких и лицами контрольной группы

Table 2. Comparison of monocyte subpopulations between COPD patients and controls

Субпопуляции моноцитов	Больные ХОБЛ	Контрольная группа	Значимость (p)
Моноциты классические, %	61,4 (47,7–72,4)	53,3 (45,5–73,7)	0,33
Моноциты промежуточные, %	26,1 (17,4–38,2)	26,8 (17,6–38,4)	0,89
Моноциты неклассические, %	10,5 (6,7–15,1)	14,4 (8,3–18,4)	0,04

Примечание: ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.

Число неклассических и промежуточных моноцитов обратно коррелировало с классическими формами ($\rho = –0,60$; $p < 0,001$ и $\rho = –0,85$; $p < 0,001$ соответственно). Данная особенность была характерна для обеих исследуемых групп. Прослеживалась тенденция к прямой корреляции между неклассической и промежуточной субпопуляциями ($\rho = 0,21$; $p = 0,08$).

При сравнении куривших и некуривших лиц контрольной группы достоверных различий в относительном количестве субпопуляций моноцитов обнаружено не было. Тем не менее, было заметно, что по аналогии с больными ХОБЛ курившие лица характеризовались некоторым снижением числа промежуточных и неклассических форм моноцитов (табл. 3). По всей видимости, различия в содержании неклассических моноцитов, выявленные между больными ХОБЛ и объединенной ппой, были преимущественно обусловлены наличием в контрольной группе некуривших лиц, поскольку при сравнении больных ХОБЛ со здоровыми курильщиками различия отсутствовали ($p = 0,34$), а при сравнении с некурившими, напротив, нарастали ($p = 0,02$).

Корреляционный анализ позволил установить, что среди больных ХОБЛ число классических моноцитов уменьшается с возрастом ($\rho = –0,33$; $p = 0,02$), а число промежуточных, наоборот, нарастает ($\rho = 0,30$; $p = 0,04$). В контрольной группе аналогичных закономерностей найдено не было.

Таблица 3. Сравнение субпопуляций моноцитов между курившими и некурившими лицами контрольной группы

Table 3. Comparison of monocyte subpopulations between smokers and non-smokers in the control group

Субпопуляции моноцитов	Курившие	Некурившие	Значимость (*p*)
Моноциты классические, %	58,1 (47,3–74,7)	51,7 (45,1–63,3)	0,31
Моноциты промежуточные, %	21,1 (17,1–36,5)	30,6 (19,8–38,4)	0,46
Моноциты неклассические, %	11,2 (7,4–17,6)	14,8 (11,4–21,5)	0,34

Мы выявили взаимосвязи числа классических и промежуточных моноцитов с параметрами вентиляционной функции легких у больных ХОБЛ (табл. 4). Большее содержание классических моноцитов было ассоциировано с более выраженной бронхиальной обструкцией, тогда как промежуточные моноциты, напротив, демонстрировали прямую корреляцию как с объемными показателями, так и с показателями проходимости дыхательных путей. Среди лиц контрольной группы была обнаружена лишь обратная корреляция промежуточных моноцитов с ПОС (ρ = –0,51; *p* = 0,009).

Таблица 4. Корреляции между числом классических и промежуточных моноцитов и показателями вентиляционной функции легких у больных хронической обструктивной болезнью легких

Table 4. Correlations between the number of classical and intermediate monocytes and parameters of pulmonary ventilation function in patients with COPD

Показатели	Классические моноциты, %	Промежуточные моноциты, %
ЖЕЛ, % от должного	ρ = –0,33; *p* = 0,02	ρ = 0,32; *p* = 0,03
ФЖЕЛ, % от должного	ρ = –0,35; *p* = 0,02	ρ = 0,34; *p* = 0,02
$ОФВ_1$, % от должного	ρ = –0,37; *p* = 0,007	ρ = 0,42; *p* = 0,003
ИТ, %	ρ = –0,22; *p* = 0,13	ρ = 0,28; *p* = 0,05
ПОС, % от должного	ρ = –0,33; *p* = 0,02	ρ = 0,33; *p* = 0,02
$МОС_{25}$, % от должного	ρ = –0,24; *p* = 0,1	ρ = 0,25; *p* = 0,08
$МОС_{50}$, % от должного	ρ = –0,32; *p* = 0,03	ρ = 0,35; *p* = 0,02
$МОС_{75}$, % от должного	ρ = –0,34; *p* = 0,02	ρ = 0,38; *p* = 0,007
$СОС_{25–75}$, % от должного	ρ = –0,39; *p* = 0,007	ρ = 0,39; *p* = 0,007

Примечание: ЖЕЛ – жизненная емкость легких, ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких, $ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за 1 с, ИТ – индекс Тиффно, ПОС – пиковая объемная скорость, $МОС_{75}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 75% ФЖЕЛ, $МОС_{50}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 50% ФЖЕЛ, $МОС_{25}$ – мгновенная объемная скорость на уровне 25% ФЖЕЛ, $СОС_{25–75}$ – средняя объемная скорость в диапазоне 25–75% ФЖЕЛ, ρ – коэффициент корреляции Спирмена, *p* – уровень статистической значимости.

При сравнительном анализе концентраций цитокинов в сыворотке крови у больных ХОБЛ были выявлены более высокие уровни MCP-1 и IL-6 (табл. 5). С индексом курения в некоторой степени был взаимосвязан только IL-17A (ρ = 0,28; *p* = 0,06).

Таблица 5. Концентрации цитокинов в плазме больных хронической обструктивной болезнью легких и лиц контрольной группы, пг/мл

Table 5. Concentrations of cytokines in the plasma of patients with COPD and control group

Показатели	Больные ХОБЛ	Контрольная группа	Значимость (*p*)
IL-4	2,48 (0,73–5,02)	1,56 (1,11–4,22)	0,69
IL-2	0,99 (0,24–1,84)	1,06 (0,54–1,60)	0,75
CXCL-10	61,0 (44,7–97,3)	61,0 (51,5–79,8)	0,99
IL-1β	6,26 (0,0–13,42)	5,38 (0,0–9,36)	0,66
TNF-α	0,81 (0,26–2,41)	1,03 (0,14–2,46)	0,85
MCP-1	62,9 (52,0–89,6)	53,7 (42,8–68,9)	0,04
IL-17A	2,29 (1,11–3,83)	1,98 (1,34–3,17)	0,67
IL-6	2,81 (1,63–4,65)	1,43 (0,49–2,44)	0,002
IL-10	1,25 (0,61–2,10)	1,12 (0,54–2,03)	0,78
IFN-γ	3,15 (0,26–5,39)	3,57 (1,11–6,59)	0,39
IL-12p70	3,29 (1,19–5,71)	2,63 (1,53–4,65)	0,77
IL-8	2,84 (1,76–4,16)	2,96 (2,0–3,69)	0,91

Примечание: ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких, IL – интерлейкин, CXCL-10 – хемокиновый лиганд 10, содержащий мотив C-X-C, TNF-α – фактор некроза опухоли α, MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1, IFN-γ – интерферон γ.

Среди больных ХОБЛ число неклассических моноцитов обратно коррелировало с концентрациями большинства цитокинов (IL-4 ρ = –0,30; *p* = 0,04; IL-2 ρ = –0,36; *p* = 0,01; IL-1β ρ = –0,35; *p* = 0,02; TNF-α ρ = –0,47; *p* < 0,001; IL-17A ρ = –0,34; *p* = 0,02; IL-6 ρ = –0,32; *p* = 0,03; IL-10 ρ = –0,34; *p* = 0,02; IFN-γ ρ = –0,35; *p* = 0,01; IL-12p70 ρ = –0,30; *p* = 0,04; IL-8 ρ = –0,40; *p* = 0,004). Среди лиц контрольной группы какие-либо корреляции между процентным содержанием субпопуляций моноцитов и уровнями цитокинов отсутствовали.

Обсуждение

В целом процент промежуточных моноцитов как среди больных ХОБЛ, так и в контрольной группе оказался заметно выше по сравнению с традиционно наблюдаемым для здоровой популяции (см. табл. 2). Мы считаем, что данная особенность преимущественно связана с возрастом обследованных, а также наличием сопутствующей патологии, в том числе скрытой. Данное предположение подтверждается выявленной прямой корреляцией между процентным содержанием промежуточных моноцитов и возрастом. Кроме этого нельзя исключать, что вклад в наблюдаемое соотношение субпопуляций моноцитов мог внести способ подготовки образцов, включающий длительную инкубацию клеток с антителами. Тем не менее, факты, которые могли бы однозначно указывать на это, в настоящее время отсутствуют.

Мы установили, что для больных ХОБЛ характерно уменьшение популяции неклассических моноцитов в периферической крови с некоторым (статистически незначимым) увеличением классической субпопуляции (см. табл. 2). Полученные данные согласуются с результатами, полученными С.П Чумаковой и соавт. [12]. В частности авторы также обнаружили увеличение доли классических моноцитов у больных ХОБЛ за счет снижения относительного числа других популяций. Эти данные вполне согласуются с патогенезом заболевания: в ответ на действие аэрополлютантов активируется местный врожденный иммунитет с последующим фагоцитозом патогенных частиц, что обусловливает потребность в классических моноцитах.

Другими исследователями были получены альтернативные данные о соотношении субпопуляций моноцитов при ХОБЛ. W.D. Cornwell и соавт. обнаружили, что ХОБЛ сопровождается увеличением количества классических и промежуточных моноцитов в крови, тогда как в случае тяжелой степени заболевания также наблюдается рост неклассической субпопуляции клеток [13]. A. Day и соавт. не нашли различий в процентном соотношении субпопуляций моноцитов крови у здоровых некурящих лиц, курильщиков и больных ХОБЛ [14]. Некоторые авторы не проводили сравнения ХОБЛ со здоровыми лицами, но сравнивали больных ХОБЛ с наличием и отсутствием дефицита α_1-антитрипсина. В результате было установлено, что у больных с дефицитом фермента неклассические моноциты в крови практически отсутствовали, а промежуточные исчезали после экспозиции с липополисахаридами (LPS) [15].

Y. Hu и соавт. с помощью секвенирования транскриптома единичных клеток проанализировали клеточный состав лейкоцитов легких и установили, что у больных ХОБЛ обнаруживается существенно больше неклассических моноцитов, чем у здоровых лиц (20,55 против 2,79%) [16]. Данное наблюдение дает основание предполагать, что сниженное число неклассических моноцитов периферической крови, обнаруженное в настоящем исследовании, может быть обусловлено усиленной миграцией данной субпопуляции клеток в легкие из системного кровотока.

Мы не выявили статистически значимых изменений в составе субпопуляций моноцитов у курильщиков без бронхиальной обструкции в сравнении со здоровыми некурившими лицами (см. табл. 3). Тем не менее, было заметно, что медианный показатель неклассических моноцитов у них несколько снижен. Таким образом, вероятна роль курения в индукции снижения содержания неклассических моноцитов при ХОБЛ. Отсутствие значимых различий между курившими и некурившими лицами контрольной группы может быть обусловлено небольшим числом обследованных.

В нашем исследовании выявлено, что в крови больных ХОБЛ преобладает продукция провоспалительных цитокинов MCP-1 и IL-6 (см. табл. 5). Повышенные концентрации MCP-1, мощного хемоаттрактанта, способствующего миграции и инфильтрации моноцитов, и IL-6, продуцируемого в большом количестве классическими макрофагами [4], являются проявлением хронического системного воспалительного ответа при ХОБЛ. R. Aldonyte и соавт. выявили увеличение аналогичных цитокинов у больных ХОБЛ при активации моноцитов LPS *in vitro* [17], что позволяет предположить, что источниками повышенных уровней MCP-1 и IL-6 в сыворотке больных ХОБЛ в нашем исследовании также являются моноциты.

Мы обнаружили обратные корреляции числа неклассических моноцитов с цитокинами в сыворотке крови больных ХОБЛ, что указывает на противовоспалительный потенциал данных клеток. Имеющиеся взгляды на природу неклассических моноцитов остаются противоречивыми: некоторые исследователи характеризуют данные клетки как слабо продуцирующие различные цитокины в ответ на стимуляцию LPS, другие, напротив, свидетельствуют о высокой способности секретировать провоспалительные медиаторы, в том числе TNF-α и IL-1β. Возможно, столь полярные мнения являются результатом использования различных подходов для получения чистой субпопуляции неклассических моноцитов [4].

Другим объяснением может служить непреднамеренная контаминация неклассических моноцитов промежуточными формами или осознанное исключение промежуточных моноцитов из анализа с дихотомическим делением популяции моноцитов на $CD14^+$ и $CD16^+$ клетки. Кроме того, первоначальные выводы о патогенной природе неклассических моноцитов при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, атеросклероз и системная красная волчанка, в большей мере оказались ошибочными, поскольку были основаны лишь на выявленной ассоциации увеличенного числа неклассических моноцитов с соответствующей патологией или ее признаками. В то же время наблюдаемое увеличение числа неклассических моноцитов лишь отражало активацию процессов саногенеза и на самом деле сдерживало прогрессирование заболевания [18].

Проведенное нами исследование позволило установить, что среди больных ХОБЛ процент классических моноцитов обратно коррелировал с проходимостью дыхательных путей. Для клеток промежуточного типа, напротив, отмечалась прямая взаимосвязь со спирометрическими показателями (см. табл. 4). При этом у лиц контрольной группы наблюдалась обратная зависимость числа промежуточных моноцитов и ПОС как одного из индикаторов проходимости дыхательных путей, что вынуждает думать о возможных функциональных различиях промежуточной субпопуляции клеток у больных ХОБЛ и здоровых лиц. Нам не удалось найти подобных исследований в мировой литературе. Доступные данные указывают лишь на связь общего числа моноцитов с обострениями ХОБЛ. При этом процентное содержание моноцитов > 10% или < 7,4% увеличивало риск развития обострений [19].

Тем не менее, в модели муковисцидоза у мышей было установлено, что повышенное число классических моноцитов, которые в отличие от промежуточных и неклассических форм экспрессируют большое количество рецепторов к MCP-1 (CCR2), ассоциировано с ремоделированием дыхательных путей и паренхимы легких. Согласно результатам исследования, данная взаимосвязь может объясняться стимулирующей ролью классических моноцитов в отношении процессов активации и рекрутинга нейтрофилов в респираторном тракте, а также повышенной продукцией фактора TGF-β и связанного с ним SMAD2-опосредованного сигналинга. При этом экспрессия классическими моноцитами CCR2 имела принципиальное значение в формировании наблюдаемых патологических изменений, поскольку их нокаут или блокирование оказывали заметный терапевтический эффект при муковисцидозе [20].

Выводы

Установлено, что больные ХОБЛ характеризуются сниженным числом циркулирующих неклассических моноцитов, что может вносить вклад в формирование системного воспалительного ответа и развитие данного заболевания. При этом более высокое содержание классических моноцитов хотя и не оказывает влияния на уровни цитокинов, по-видимому, способствует прогрессированию бронхиальной обструкции у больных ХОБЛ.

Интерес для дальнейших исследований представляет изучение молекулярных механизмов, регулирующих

дифференцировку промежуточных и неклассических моноцитов из классических форм, и характеристика их состояния у больных ХОБЛ. Кроме этого, ввиду дефицита информации, внимания заслуживает более углубленный анализ функциональных особенностей отдельных субпопуляций моноцитов при ХОБЛ *in vitro*, в том числе фагоцитарной активности, продукции цитокинов, экспрессии рецепторов, позволяющих реагировать на факторы хемотаксиса, а также способности дифференцироваться в M1/M2 макрофаги.

Литература / References

1. Boers E., Barrett M., Su J.G., Benjafield A.V., Sinha S., Kaye L. et al. Global burden of chronic obstructive pulmonary disease through 2050. *JAMA Netw. Open*. 2023;6(12):2346598. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.46598.
2. Pérez-Rubio G., Cordoba-Lanus E., Cupertino P., Cartujano-Barrera F., Campos M.A., Falfán-Valencia R. Role of genetic susceptibility in nicotine addiction and chronic obstructive pulmonary disease. *Rev. Invest. Clin.* 2019;71:36–54. DOI: 10.24875/RIC.18002617.
3. Lee Y., Song J., Jeong Y., Choi E., Ahn C., Jang W. Meta-analysis of single-cell RNA-sequencing data for depicting the transcriptomic landscape of chronic obstructive pulmonary disease. *Comput. Biol. Med.* 2023;167:107685. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2023.107685.
4. Williams H., Mack C., Baraz R., Marimuthu R., Naralashetty S., Li S. et al. Monocyte differentiation and heterogeneity: Inter-subset and interindividual differences. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(10):8757. DOI: 10.3390/ijms24108757.
5. Калашникова А.А., Ворошилова Т.М., Чиненова Л.В., Давыдова Н.И., Калинина Н.М. Субпопуляции моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом. *Медицинская иммунология.* 2018;20(6):815–824.
   Kalashnikova A., Voroshilova T., Chinenova L., Davydova N.I., Kalinina N.M. Monocyte subsets in healthy adults and sepsis patients. *Medical Immunology. Meditsinskaya Immunologiya.* 2018;20(6):815–824. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-815-824.
6. Evren E., Ringqvist E., Tripathi K.P., Sleiers N., Rives I.C., Alisjahbana A. et al. Distinct developmental pathways from blood monocytes generate human lung macrophage diversity. *Immunity.* 2021;54(2):259–275.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.12.003.
7. Vishnyakova P., Poltavets A., Karpulevich E., Maznina A., Vtorushina V., Mikhaleva L. et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 2021;139:111614. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111614.
8. Szaflarska A., Baj-Krzyworzeka M., Siedlar M., Weglarczyk K., Ruggiero I., Hajto B. et al. Antitumorfront response of $CD14^+/CD16^+$ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol.* 2004;32:748–755. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.05.027.
9. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 2008;67(2):152–159. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x.
10. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 2014;5:514 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.
11. Whyte C.E., Tumes D.J., Liston A., Burton O.T. Do more with less: Improving high parameter cytometry through overnight staining. *Curr. Protoc.* 2022; 2(11):e589. DOI: 10.1002/cpz1.589.
12. Чумакова С.П., Винс М.В., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Пряхин А.С. и др. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией. *Бюллетень сибирской медицины.* 2019;18(1):277–285.
    Chumakova S.P., Vins M.V., Urazova O.I. Azarova D.A., Shipulin V.M., Pryakhin A.S. et al. Subpopulations of blood monocytes in patients with generalized hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(1):277–285. (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2019-1-277-285.
13. Cornwell W.D., Kim V., Fan X., Vega M.E., Ramsey F.V., Criner G.J. et al. Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm. Med.* 2018;15;18(1):101. DOI: 10.1186/s12890-018-0664-y.
14. Day A., Barnes P., Donelly L. Monocyte sub-populations do not reflect differences in COPD macrophage phenotype. *Eur. Respir. J.* 2015;46:PA383. DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA383.
15. Stolk J., Aggarwal N., Hochnadel I., Wrenger S., Martinez-Delgado B., Welte T. et al. Blood monocyte profiles in COPD patients with PiMM and PiZZ α_1-antitrypsin. *Respir. Med.* 2019;148:60–62. DOI: 10.1016/j.rmed.2019.02.001.
16. Hu Y., Shao X., Xing L., Li X., Nonis G.M., Koelwyn G.J. et al. Single-cell sequencing of lung macrophages and monocytes reveals novel therapeutic targets in COPD. *Cells.* 2023;12(24):2771. DOI: 10.3390/cells12242771.
17. Aldonyte R., Jansson L., Piitulainen E., Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir. Res.* 2003;4(1):11. DOI: 10.1186/1465-9921-4-11.
18. Chimen M., Yates C.M., McGettrick H.M., Ward L.S., Harrison M.J., Apta B. et al. Monocyte subsets coregulate inflammatory responses by integrated signaling through TNF and IL-6 at the endothelial cell interface. *J. Immunol.* 2017;198:2834–2843. DOI: 10.4049/jimmunol.1601281.
19. Lin C.H., Li Y.R., Lin P.R., Wang B.Y., Lin S.H., Huang K.Y. et al. Blood monocyte levels predict the risk of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective case-control study. *Sci. Rep.* 2022;12(1):21057. DOI: 10.1038/s41598-022-25520-8.
20. Öz H.H., Cheng E.C., Di Pietro C., Tebaldi T., Biancon G., Zeiss C. et al. Recruited monocytes/macrophages drive pulmonary neutrophilic inflammation and irreversible lung tissue remodeling in cystic fibrosis. *Cell Rep*. 2022;41(11):111797. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111797.

Информация о вкладе авторов

Сугайло И.Ю. – проточная цитометрия, написание черновика рукописи.
Наумов Д.Е. – концепция исследования, написание черновика рукописи.
Котова О.О. – определение уровней цитокинов, статистический анализ.
Гассан Д.А. – статистический анализ, интерпретация результатов.
Горчакова Я.Г. – подготовка базы данных, статистический анализ.
Шелудько Е.Г. – формирование выборки обследуемых, получение биологических образцов, редактирование рукописи.
Все авторы дали окончательное согласие на подачу рукописи и согласились нести ответственность за все аспекты работы, ручаясь за их точность и безупречность.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information on author contributions

Sugaylo I.Yu. – flow cytometry, writing the draft manuscript.
Naumov D.E. – study concept, writing the draft manuscript.
Kotova O.O. – measurement of cytokine levels, statistical analysis.
Gassan D.A. – statistical analysis, interpretation of the results.
Gorchakova Ya.G. – database preparation, statistical analysis.
Sheludko E.G. – forming a study sample, obtaining biological samples, editing the manuscript.
All authors gave final consent to submit the manuscript and agreed to be responsible for all aspects of the work, vouching for its accuracy and integrity.

Conflict of interest: the authors do not declare a conflict of interest.

Сведения об авторах

Сугайло Ивана Юрьевна, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0002-9170-1245.
E-mail: ivanka_888@mail.ru

Information about the authors

Ivana Yu. Sugaylo, Cand. Sci. (Med.), Junior Research Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0002-9170-1245.
E-mail: ivanka_888@mail.ru.

Наумов Денис Евгеньевич, канд. мед. наук, заведующий лабораторией молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0003-3921-8755.
E-mail: denn1985@bk.ru.

Котова Олеся Олеговна, канд. мед. наук, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0002-1984-2596.
E-mail: foxy_voxy_on@mail.ru.

Гассан Дина Анатольевна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0003-3718-9962.
E-mail: dani-shi@mail.ru.

Горчакова Яна Геннадьевна, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0002-8819-2646.
E-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com.

Шелудько Елизавета Григорьевна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, ДНЦ ФПД, Благовещенск, http://orcid.org/0000-0001-6622-5198.
E-mail: liza.sheludko@mail.ru.

✉ **Сугайло Ивана Юрьевна,** e-mail: ivanka_888@mail.ru.

Поступила 03.05.2024;
рецензия получена 18.06.2024;
принята к публикации 14.11.2024.

Denis E. Naumov, Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0003-3921-8755.
E-mail: denn1985@bk.ru.

Olesya O. Kotova, Cand. Sci. (Med.), Junior Research Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0002-1984-2596.
E-mail: foxy_voxy_on@mail.ru.

Dina A. Gassan, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0003-3718-9962.
E-mail: dani-shi@mail.ru.

Yana G. Gorchakova, Research Assistant, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0002-88192646.
E-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com.

Elizaveta G. Sheludko, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Blagoveshchensk, http://orcid.org/0000-0001-6622-5198.
E-mail: liza.sheludko@mail.ru.

✉ **Ivana Yu. Sugaylo,** e-mail: ivanka_888@mail.ru.

Received 03.05.2024;
review received 18.06.2024;
accepted for publication 14.11.2024.