

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ИММУНОСУПРЕССИИ НА ЭФФЕКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ  
В БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ СМЫВЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ  
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У КРЫС

© 2019 г. О. Н. Титова<sup>1</sup>, Н. А. Кузубова<sup>1</sup>,  
Е. С. Лебедева<sup>1, \*</sup>, Т. Н. Преображенская<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: osmelena@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2018 г.

После доработки 01.04.2019 г.

Принята к публикации 02.04.2019 г.

На модели хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), индуцированной у крыс 60-дневным воздействием диоксида азота, оценивали влияние иммуносупрессии на характер и скорость формирования структурно-функциональных нарушений в легких. В условиях индуцированной с помощью циклофосфана иммуносупрессии отмечалась более ранняя активация воспалительного процесса в легких: усиливался приток нейтрофилов, увеличивалось содержание в крови высоко патогенных иммунных комплексов средней молекулярной массы, возрастало содержание провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. В отличие от контрольной группы признаки повреждения респираторного эпителия и перестройки легочной ткани с проявлениями эмфиземы, склероза и фиброобразования, характерные для модели ХОБЛ, выявлялись уже через 30 (а не 60) дней от начала ингаляционного воздействия диоксида азота. Результаты исследования позволяют полагать, что при воздействии аэрогенных агрессивных веществ, повреждающих респираторный эпителий, исходная иммунная дисфункция может способствовать формированию провоспалительной среды и фенотипа преждевременного старения легких, предрасполагающих к развитию хронической обструктивной легочной патологии.

*Ключевые слова:* хроническая обструктивная болезнь легких, иммуносупрессия, циклофосфан, диоксид азота, воспаление, провоспалительные цитокины

DOI: 10.1134/S0869813919060086

В ряду основных факторов формирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) важное место отводится развитию хронического воспаления в ответ на вдыхание агрессивных поллютантов и феномену ускоренного старения легких [1–3]. Это заболевание выявляет все признаки старения, включая укорочение теломер, клеточное старение, дисфункцию иммунной системы и митохондрий, нарушение аутофагии, истощение в легочной ткани стволовых клеток и антиэйджинговых молекул (сиртуинов и белков клото), вялотекущее хроническое воспаление (“инфламэйджинг”) [4, 5]. По мнению ряда авторов, базовым механизмом ускоренного старения легких является старение системы иммунитета – как врожденного, так и адаптивного [1, 2, 6]. Хроническое, происходящее на протяжении

жизни воздействие различных токсичных оксидантных веществ (сигаретного дыма, промышленных и бытовых загрязнителей воздуха) способствует иммунологическому старению и формированию ассоциированного со старением секреторного провоспалительного фенотипа [7, 8]. Преждевременное старение легких приводит к снижению легочной функции, способности адекватно реагировать на экологические стрессы, оказывает влияние на репаративные механизмы, индуцируя aberrантную активацию иммунной системы и стимулируя локальное и системное воспаление, повышает восприимчивость к инфекции [1, 9, 10].

Цель исследования: оценить особенности формирования структурно-функциональных нарушений в легких при моделировании ХОБЛ у крыс в условиях иммуносупрессии, индуцированной циклофосфаном.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили крысы-самцы Вистар ( $n = 55$ ) массой 160–180 г разведения питомника лабораторных животных “Рапполово” РАН (Всеволожский р-н Ленинградской обл.). Исследования проводились в соответствии с регламентом, установленным приказом МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 “Правила лабораторной практики” и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Модель формирования ХОБЛ воспроизводили с помощью ингаляционного воздействия диоксида азота ( $\text{NO}_2$ ) [11]. Животных помещали в камеру, смонтированную в вытяжном шкафу и соединенную шлангом с лабораторной установкой для получения *ex tempore* диоксида азота. Навеску нитрита натрия (50 мг) помещали в колбу Вюрца и с помощью делительной воронки по каплям прибавляли серную кислоту. В результате химической реакции образовывалась смесь оксидов азота. Под влиянием кислорода воздуха, содержащегося в колбе, бесцветный оксид азота переходил в наиболее стабильный желто-бурый диоксид, который по отводной трубке нагнетался в камеру с животными. Концентрация  $\text{NO}_2$  определялась колориметрическим методом и составляла 30–40 мг/м<sup>3</sup>. Животные на протяжении 60 дней подвергались воздействию диоксида азота в прерывистом режиме: три раза в день по 30 мин с получасовым интервалом между ингаляциями. Для создания индуцированной иммуносупрессии перед началом и через семь дней ингаляций диоксида азота 23 крысам внутрибрюшинно вводили алкилирующий препарат циклофосфан (50 мг/кг, ОАО “Биохимия”, Россия), подавляющий клеточный и гуморальный иммунитет [12]. Особи контрольной группы ( $n = 23$ ) получали внутрибрюшинные инъекции 0.9%-ного раствора хлорида натрия. Животных из каждой группы выводили из опыта после 30 ( $n = 11$ ) и 60 дней ( $n = 12$ ) экспозиции диоксидом азота. Интактную группу составили 9 крыс, не подвергавшихся воздействию диоксида азота. Эвтаназию осуществляли методом цервикальной дислокации.

Пробы крови получали пункцией левого желудочка сердца. Для получения бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) в легкие через внутритрахеальный катетер с помощью шприца вводили 4–5 мл физиологического раствора (35°C) и повторяли процедуру 3–4 раза. Лаважную жидкость собирали в силиконизированные пробирки, центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Для определения цитограммы БАЛЖ в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, проводили подсчет различных клеточных элементов на 200 клеток с расчетом процентного содержания. Оценивали фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов, выделенных из БАЛЖ, и нейтрофилов, выделенных из периферической крови [13]. Для получения альвеолярных макрофагов клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл среды 199 с последующим определением количества макрофагов в камере Горяева и доведением концентрации клеток до  $1 \times 10^6$ /мл в питательной среде, содержащей

5% эмбриональной телячьей сыворотки. Нейтрофилы выделяли на двойном градиенте плотности, трижды отмывали средой 199, подсчитывали количество клеток в 1 мл. В качестве объекта фагоцитоза использовали стандартные частицы латекса размером 0.8 мкм. К суспензиям клеток-фагоцитов добавляли частицы латекса (0.1 мл) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Образцы окрашивали по Романовскому–Гимзе и обсчитывали с помощью светового микроскопа. При использовании прямого визуального метода рассчитывали фагоцитарный индекс (процент фагоцитирующих клеток) и фагоцитарное число (среднее количество частиц латекса, захваченных одной клеткой). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови и БАЛЖ определяли методом, основанным на селективной преципитации растворимых комплексов антиген–антитело при различной концентрации полиэтиленгликоля (6000 Da): при концентрации 3.75% осаждаются ЦИК большой молекулярной массы, при концентрации 7% – ЦИК средней молекулярной массы [14]. Изменение светорассеивания раствора полиэтиленгликоля из-за изменения его плотности вследствие осаждения ЦИК регистрировали на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Результаты выражали в единицах оптической плотности. Для гистологических исследований легкие расправляли введением через трахею 10%-ного раствора нейтрального формальдегида. Стандартно забранный материал заключали в парафин, срезы толщиной 5–7 мкм красили гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону.

В пробах БАЛЖ определяли содержание фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ), интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-17 (IL-17), нейтрофильной эластазы (NE), секреторного иммуноглобулина А (sIgA), сурфактант-ассоциированных протеинов В (SP-B) и D (SP-D) методом иммуноферментного анализа ELISA с использованием видоспецифичных коммерческих тест-систем фирмы Cusabio Biotech (Китай).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Windows). Определяли средние арифметические величины ( $M$ ), стандартную ошибку средней величины ( $m$ ). Проводили проверку данных по характеру распределения с помощью программы “Statistica 6.0”. Достоверность различий двух сравниваемых средних арифметических величин производили по  $t$ -критерию Стьюдента. Достоверность результатов также оценивали по критерию Манна–Уитни. Различия сравниваемых показателей считались достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ цитограммы БАЛЖ (табл. 1) показал, что под влиянием 60-дневного ингаляционного воздействия диоксида азота в контроле и в группе с иммуносупрессией возрастало процентное и абсолютное содержание нейтрофилов. В обеих группах процентное содержание макрофагов было меньше интактного значения на протяжении всего периода экспозиции в отличие от их абсолютного числа, которое к 60 дню возвращалось к исходному уровню. В условиях иммуносупрессии содержание лимфоцитов в БАЛЖ (процентное и абсолютное) было снижено на протяжении всего 60-дневного периода, в то время как в БАЛЖ контрольных особей аналогичный показатель значительно превышал интактный уровень.

Содержание в сыворотке крови ЦИК большой молекулярной массы не претерпевало достоверных изменений ни в одной из групп в течение всего 60-дневного периода эксперимента, достоверно не отличаясь от базового уровня интактных крыс ( $37.2 \pm 4.2$  усл. ед.). Концентрация ЦИК средней молекулярной массы возрастала по мере увеличения продолжительности экспозиции диоксидом азота, причем в условиях иммуносупрессии значительно быстрее, чем в группе с нормальной иммунной реактивностью. Уже после 30-дневной экспозиции их содержание превышало интактный уровень ( $68.2 \pm 8.5$  усл. ед.) в четыре раза и составило  $268.1 \pm 14.1$  усл. ед. (в контроле  $119.1 \pm 8.9$ ,  $p < 0.05$ ), а после 60-дневной – в три раза

**Таблица 1.** Влияние иммуносупрессии на клеточный состав бронхоальвеолярной лаважной жидкости крыс в процессе формирования модели ХОБЛ

Показатели	Интактная группа	30 дней NO <sub>2</sub>		60 дней NO <sub>2</sub>	
		контроль	циклофосфан	контроль	циклофосфан
Макрофаги, % × 10 <sup>4</sup> кл/мл	90.8 ± 2.8 71 ± 6	58.1 ± 4.3*	68.1 ± 3.1*	57.8 ± 3.8*	67.4 ± 4.1*
Нейтрофилы, % × 10 <sup>4</sup> кл/мл	2.9 ± 0.7 2 ± 0.1	22.3 ± 1.7*	29.6 ± 1.3**	25.6 ± 3.2*	31.4 ± 2.8*
Лимфоциты, % × 10 <sup>4</sup> кл/мл	6.3 ± 1.5 5 ± 0.3	19.6 ± 1.3*	2.3 ± 0.6**	16.5 ± 2.1*	1.2 ± 0.4**
		17 ± 2*	2 ± 0.03**	18 ± 3*	1 ± 0.02**

\* – различие с интактной группой достоверно,  $p < 0.05$ ; \*\* – различие с группой “контроль” достоверно,  $p < 0.05$ .

**Таблица 2.** Влияние иммуносупрессии на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов и нейтрофилов периферической крови в процессе формирования модели ХОБЛ

Группы животных	Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов		Фагоцитарная активность нейтрофилов	
	ФИ, %	ФЧ, ед.	ФИ, %	ФЧ, ед.
Интактные	22.4 ± 4.8	1.6 ± 0.4	31.0 ± 3.6	1.1 ± 0.1
30 дней NO <sub>2</sub> (контроль)	46.4 ± 5.2*	2.6 ± 0.4	45.1 ± 4.3*	3.5 ± 0.1*
30 дней NO <sub>2</sub> + ЦФ	15.6 ± 2.8**	0.8 ± 0.1**	80.0 ± 8.1**	9.3 ± 1.9**
60 дней NO <sub>2</sub> (контроль)	31.2 ± 3.2*	2.7 ± 0.3	42.3 ± 3.1*	3.0 ± 0.1*
60 дней NO <sub>2</sub> + ЦФ	13.2 ± 1.9**	0.9 ± 0.2**	60.1 ± 5.7*	8.0 ± 1.8**

ЦФ – циклофосфан; ФИ – фагоцитарный индекс; ФЧ – фагоцитарное число; \* – различие с интактной группой достоверно,  $p < 0.05$ ; \*\* – различие с группой “контроль” достоверно,  $p < 0.05$ .

(196.3 ± 12.8 усл. ед.,  $p < 0.05$ ), против двукратного превышения в контроле (128.1 ± 9.1 усл. ед.,  $p < 0.05$ ). В пробах БАЛЖ интактных крыс ЦИК средней молекулярной массы не выявлялись. В условиях иммуносупрессии их присутствие в БАЛЖ регистрировалось уже в середине экспозиционного периода (19.2 ± 2.1 усл. ед.), в то время как в контрольной группе только после 60-дневной экспозиции диоксидом азота (15.4 ± 1.8 усл. ед.). К 60-му дню экспозиции концентрация средних ЦИК в группе с иммуносупрессией достигала 27.4 ± 2.7 усл. ед. ( $p < 0.05$ ).

В группе с иммуносупрессией отмечалось значительное снижение показателей фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов, в то же время показатели поглощательной способности нейтрофилов периферической крови существенно превышали значения интактной и контрольной группы (табл. 2).

По мере удлинения продолжительности экспозиции диоксидом азота нарастало присутствие в бронхоальвеолярном пространстве провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-8, IL-17 и NE (табл. 3). При этом в пробах БАЛЖ, полученных от крыс с иммуносупрессией, наблюдался опережающий по сравнению с контрольной группой прирост содержания TNF $\alpha$ , IL-8 и NE. Более низкие по сравнению с контролем значения концентрации IL-17 в группе с иммуносупрессией могли быть обусловлены подавляющим эффектом циклофосфана на популяцию Т-лимфоцитов, поскольку основным продуцентом IL-17 являются CD4+Th17-клетки и в меньшей степени нейтрофилы и CD8+Th17-клетки [15].

В условиях подавления иммунологической реактивности значительно быстрее происходили структурные изменения в легочной ткани. Уже после 30 дней воздействия диоксида азота имелось очевидное сходство с морфологической картиной, которая наблюдалась в легких контрольных крыс после 60-дневной экспозиции

**Таблица 3.** Влияние иммуносупрессии на цитокиново-ферментный профиль БАЛЖ и показатели функциональной активности бронхоальвеолярного эпителия крыс в процессе формирования модели ХОБЛ

Показатели	Интактная группа	30 дней NO <sub>2</sub>		60 дней NO <sub>2</sub>	
		контроль	циклофосфан	контроль	циклофосфан
TNF $\alpha$ , пг/мл	15.7 $\pm$ 1.5	25.4 $\pm$ 1.3*	35.5 $\pm$ 2.1**	32.5 $\pm$ 3.1*	41.3 $\pm$ 2.8**
IL-8, пг/мл	23.7 $\pm$ 1.4	31.2 $\pm$ 1.1*	39.8 $\pm$ 1.1**	41.2 $\pm$ 2.6*	49.7 $\pm$ 3.0**
IL-17, пг/мл	53.4 $\pm$ 4.8	69.5 $\pm$ 3.4*	61.3 $\pm$ 3.3	98.7 $\pm$ 5.4*	76.5 $\pm$ 4.8**
NE, нг/мл	16.5 $\pm$ 2.2	21.7 $\pm$ 2.0	29.7 $\pm$ 1.8**	33.2 $\pm$ 2.3*	42.2 $\pm$ 2.1**
sIgA, мкг/мг белка	28.2 $\pm$ 1.6	16.7 $\pm$ 2.1*	12.7 $\pm$ 3.1*	12.6 $\pm$ 1.4*	9.6 $\pm$ 1.8*
SP-B, пг/мкг белка	39.4 $\pm$ 3.2	48.6 $\pm$ 3.4*	54.4 $\pm$ 4.4*	64.4 $\pm$ 5.6*	70.6 $\pm$ 5.2*
SP-D, пг/мл	73.6 $\pm$ 4.7	53.3 $\pm$ 3.7*	47.7 $\pm$ 3.8*	55.2 $\pm$ 6.1*	41.8 $\pm$ 3.3*

\* – различие с интактной группой достоверно,  $p < 0.05$ ; \*\* – различие с группой “контроль” достоверно,  $p < 0.05$ .

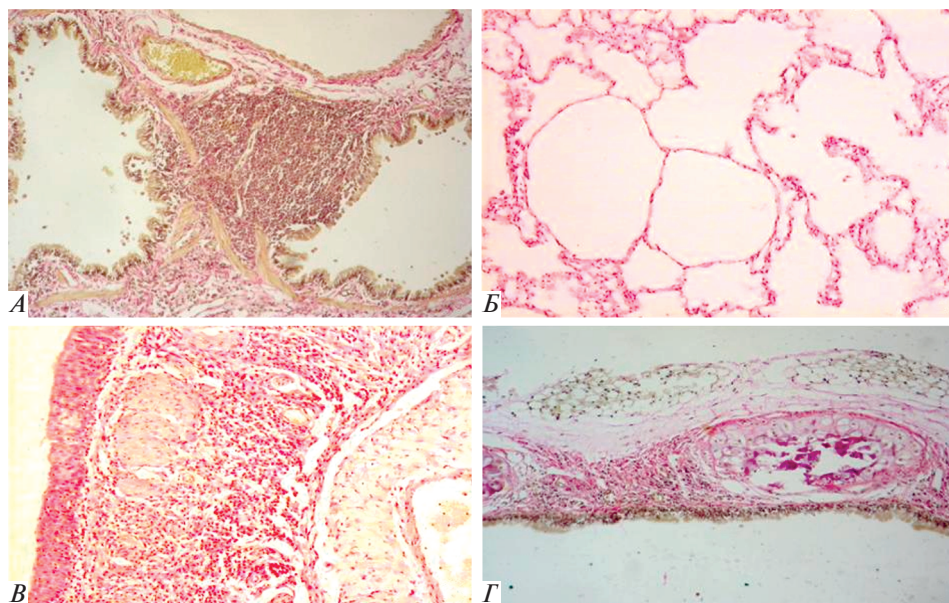
диоксидом азота [11]. Структурные изменения характеризовались дедифференцировкой и атрофией трахеобронхиального эпителия с утратой ресничек, очаговой гиперплазией бокаловидных клеток, десквамацией и атрофией эпителия с обнажением базальных отделов. Реснитчатый эпителий замещался одно-, двухрядным кубическим эпителием. В респираторных отделах встречались скопления макрофагов, отмечались отек и лейкоцитарная инфильтрация соединительной ткани вокруг сосудов и бронхов, умеренно выраженный перибронхиальный и периваскулярный склероз, очаги фиброза. Определялись участки плоскоклеточной метаплазии бронхиального эпителия, дистрофии эпителия бронхиальных желез с нарушением секреторного образования. В респираторных бронхиолах и альвеолярных ходах встречались участки расширения, а в подплевральных отделах – участки панацинарной эмфиземы, истончение межальвеолярных перегородок, редукция капиллярного русла (рис. 1А–Г).

Неизбежным следствием повреждения структуры бронхоальвеолярного эпителия является ухудшение его функциональной активности, что нашло отражение в динамике показателей его функционального состояния (sIgA, SP-D и SP-B), которая была сходной в обеих исследованных группах (табл. 3). Несколько более выраженными были изменения в группе с иммуносупрессией, но значимого различия с контрольной группой не наблюдалось.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вдыхание пневмотоксиканта диоксида азота, являющегося важным компонентом сигаретного дыма и выхлопных газов, активизирует эпителиальные клетки бронхов, либо непосредственно воздействуя на рецепторы распознавания (Toll-подобные рецепторы), либо опосредовано через выделение молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP) [16]. Активированные эпителиоциты реализуют провоспалительные цитокины и хемокины, которые рекрутируют в бронхоальвеолярное пространство клетки воспаления. Иммунодепрессивное действие циклофосфана обусловлено выраженной антипролиферативной активностью компонента циклофосфамида. Особенно сильное влияние он оказывает на быстро делящиеся популяции лимфоцитов, подавляя Т-клеточный иммунитет на 5–7 день после однократного введения и вызывая развитие лимфопении [17].

Более высокая концентрация ЦИК средней молекулярной массы в крови животных с иммуносупрессией по сравнению с контролем могла быть обусловлена угнетающим эффектом циклофосфамида на продукцию антител. При недостаточности синтеза антител в организме формируются иммунные комплексы среднего размера, обладающие высокой патогенностью, длительно циркулирующие в сосу-



**Рис. 1.** *А* – гиперплазия бокаловидных клеток, умеренный склероз стенки с диффузной лимфоплазмочитарной инфильтрацией, гиперплазия лимфоидного образования. *Б* – панацинарная эмфизема, истончение межальвеолярных перегородок, редукция капиллярного русла, очаговая периваскулярная лимфоидная инфильтрация. *В* – дисрегенераторные нарушения в слизистой оболочке бронха с участками метаплазии эпителия, диффузный и очаговый склероз, отек и диффузная лимфомоноцитарная инфильтрация с примесью лейкоцитов в стенке бронха, гипертрофия мышечной оболочки бронхиальной артерии. *Г* – диффузный склероз стенки бронха, одиночные скопления лимфоидных клеток в субэпителиальных отделах, сглаженность слизистой оболочки с участками атрофии эпителия, нарушение секретобразования и дистрофия эпителия бронхиальных желез.

дистом русле и способные инициировать в тканях цепь последовательных патологических процессов [12]. Они могут взаимодействовать с лимфоцитами и нейтрофилами, изменяя их функциональное состояние, блокировать Fc-рецепторы В-лимфоцитов, что приводит к снижению продукции антител и еще большему увеличению отношения антиген/антитело [12]. Появление иммунных комплексов в бронхоальвеолярном пространстве крыс с иммуносупрессией уже на 30-й день экспозиции диоксидом азота свидетельствовало о повреждении бронхоальвеолярного эпителия и, как следствие, увеличении его проницаемости в более ранние по сравнению с контрольной группой сроки. Высокая концентрация средних ЦИК в крови и БАЛЖ крыс с иммуносупрессией могла быть обусловлена функциональной подавленностью моноцитарной фагоцитарной системы, осуществляющей клиренс иммунных комплексов: в отличие от контрольной группы отмечалось значительное снижение показателей фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов (фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа), что является характерным признаком макрофагов стареющего организма [18]. Поглощение иммунных комплексов нейтрофилами периферической крови сопровождается усилением их адгезивной способности, в результате они легче прилипают к эндотелию сосудов, поддерживая локальный воспалительный процесс. Субэндотелиальное отложение иммунных комплексов сопровождается рекрутированием и активацией нейтрофилов и резидентных макрофагов, а продуцируемые ими кислородные радикалы и протеазы (в частности, нейтрофильная эластаза), обладающие мощным деструктивным потен-

циалом, вызывают вторичное повреждение ткани легких с разрушением структурных элементов легких и формированием эмфиземы [19].

Длительное ингаляционное воздействие оксидантных поллютантов (сигаретного дыма, выхлопных газов, компонентом которых является диоксид азота) на клетки бронхоальвеолярного эпителия вызывает молекулярное повреждение, приводящее к остановке клеточного цикла и накоплению стареющих клеток [20]. Через ауто/паракринные механизмы стареющие клетки влияют на клетки микроокружения, изменяя профиль секретируемых молекул, получивший название ассоциированного со старением секреторного фенотипа [20–22]. В патогенезе ХОБЛ в качестве компонентов фенотипа старения, активирующих воспалительные и резидентные клетки, рассматриваются различные цитокины, в число которых входят TNF $\alpha$  и IL-8 [6, 20, 23], концентрация которых в БАЛЖ особей с иммуносупрессией достоверно превышала значения этих показателей в контрольной группе в течение всего экспозиционного периода. С повреждением структуры респираторного эпителия напрямую связано снижение содержания в БАЛЖ обеих групп sIgA и SP-D. Секреторный IgA, синтезируемый плазматическими клетками базальной мембраны и транспортируемый на поверхность эпителия полииммуноглобулиновым рецептором (pIgR), является маркером местного врожденного иммунитета. Эпителий с бокало-видноклеточной гиперплазией и повреждениями цилиарного аппарата характеризуется дефицитом sIgA на поверхности, что свидетельствует о явных нарушениях его иммунобарьерной функции. У мышей с дефицитом pIgR и недостатком sIgA по мере старения спонтанно развивается обструктивная патология легких с прогрессирующей ремоделированием дыхательных путей, эмфиземой, лейкоцитарной инфильтрацией, увеличением экспрессии нейтрофильной эластазы [24]. Снижение содержания гидрофильного SP-D, являющегося компонентом врожденной эпителиальной иммунной защиты, могло быть следствием повреждения легочного эпителия, апоптоза секретирующих SP-D альвеолоцитов 2 типа и нецилиарных клеток бронхиол и “утечки” SP-D в системный кровоток [25]. Увеличение содержания в БАЛЖ гидрофобного SP-B, синтезируемого и секретируемого альвеолоцитами 2 типа, служит еще одним подтверждением повреждения альвеолярного эпителия и деструкции сурфактантной выстилки. В опытах на клеточной культуре A549, сходной с альвеолоцитами 2 типа, повреждение клеток сопровождалось выходом SP-B во внеклеточное пространство и снижением его внутриклеточной концентрации [26]. Окисление SP-B озоном нарушало его структуру, вело к потере способности взаимодействовать с фосфолипидами на границе аэрогематического барьера и, как следствие, утрате его основной биологической функции – снижения поверхностного натяжения [27].

Таким образом, в условиях индуцированной с помощью циклофосфана иммуносупрессии существенно ускорялось развитие структурно-функциональных нарушений в легких, происходящих при формировании модели ХОБЛ. Отмечалась более ранняя и выраженная по сравнению с особями с нормальной иммунологической реактивностью активация воспалительного процесса в легких: усиливался приток нейтрофилов, увеличивалось содержание высоко патогенных иммунных комплексов средней молекулярной массы, возрастало содержание провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. В отличие от контрольной группы признаки повреждения респираторного эпителия и структурной перестройки легочной ткани с проявлениями эмфиземы, склероза и фиброзирования, характерные для модели ХОБЛ, выявлялись уже через 30 (а не 60) дней от начала ингаляционного воздействия пневмотоксиканта диоксида азота, что, возможно, обусловлено более ранними проявлениями активации локального и системного воспаления. Для подтверждения этого предположения в дальнейшем планируется провести целенаправленную оценку наблюдаемых изменений легочной архитекто-

ники с привлечением детального морфометрического анализа гистологических препаратов легких. Результаты исследования позволяют полагать, что при воздействии аэрогенных агрессивных веществ, повреждающих респираторный эпителий, исходная иммунная дисфункция может способствовать формированию провоспалительной среды и фенотипа преждевременного старения легких, предрасполагающих к развитию хронической обструктивной легочной патологии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mercado N., Ito K., Barnes P.J. Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax*. 70(5): 482–489. 2015.
2. MacNee W. Is chronic obstructive pulmonary disease an accelerated aging disease? *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 (Suppl.): S429–S437. 2016.
3. Bartling B., Hofmann H.S. Reduced proliferation capacity of lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Z. Gerontol. Geriatr.* 2018. <https://doi.org/10.1007/s00391-018-1377-9>
4. Ahmad T., Sundar I.K., Tormos A.M., Lerner C.A., Gerloff J., Yao H., Rahman I. Shelterin telomere protection protein 1 reduction causes telomere attrition and cellular senescence via sirtuin 1 deacetylase in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 56(1): 38–49. 2017.
5. Barnes P.J. Senescence in COPD and its comorbidities. *Annu. Rev. Physiol.* 79: 517–539. 2017.
6. Kuwano K., Araya J., Hara H., Minagawa S., Takasaka N., Ito S., Nakayama K. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respir. Investig.* 54(6): 397–406. 2016.
7. Ventura M.T., Casciaro M., Gangemi S., Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin. Mol. Allergy.* 15: 21. 2017.
8. Baker J.R., Vuppasetty C., Colley T., Hassibi S., Fenwick P.S., Donnelly L.E., Ito K., Barnes P.J. MicroRNA-570 is a novel regulator of cellular senescence and inflammaging. *FASEB J.* 33(2): 1605–1616. 2019.
9. Aoshiba R., Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6(7): 596–601. 2009.
10. Chilosi M., Carloni A., Rossi A., Poletti V. Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl. Res.* 162(3): 156–173. 2013.
11. Lebedeva E.S., Kuzubova N.A., Danilov L.N., Titova O.N., Dvorakovskaya I.V., Preobrazhenskaya T.N., Platonova I.S. Experimental modelling of chronic obstructive pulmonary disease. *Bull. Exper. Biol. Med.* 152(5): 659–663. 2012.
12. Оковитый С.В. Клиническая фармакология иммунодепрессантов. *Обзоры по клин. фармакол. и лекарственной терапии.* 2(2): 2–34. 2003. [Okovity S.V. Clinical pharmacology of immunosuppressants. *Rev. Clin. Pharm. Drug Ther.* 2(2): 2–34. 2003. (In Russ.)].
13. Шмелев Е.И., Бумагина Г.К., Мизерева Ю.Т. Феномен антигенспецифической супрессии функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных хроническим бронхитом и абсцессами легких. *Иммунология.* 3: 61–64. 1981. [Shmelev E.I., Bumagina G.K., Mizereva Yu.T. The phenomenon of antigen-specific suppression of the functional activity of peripheral blood neutrophils in patients with chronic bronchitis and lung abscesses. *Immunology.* 3: 61–64. 1981. (In Russ.)].
14. Haškova V., Kašlik J., Mate J., Matějková M. Nový způsob stanovení cirkulujících imunokomplexů v lidských serech. *Cas. Lek. Ces.* 116(14): 437–438. 1977. [Haškova V., Kašlik J., Mate J., Matejkova M. New method for determining circulating immunocomplexes in human serums. *Time Med. Ces.* 116(14): 437–438. 1977. (In Czech.)].
15. Yanagisawa H., Hashimoto M., Minagawa S., Takasaka N., Ma R., Moermans C., Ito S., Araya J., Budelsky A., Goodsell A., Baron J.L., Nishimura S.L. Role of IL-17A in murine models of COPD airway disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 312(1): L122–L130. 2017.
16. Gao W., Li L., Wang Y., Zhang S., Adcock I.M., Barnes P.J., Huang M., Yao X. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology.* 20(5): 722–729. 2015.
17. Лосева Л.Ф., Доненко Ф.В., Лебединская О.В., Ахматов Э.А., Лебединская Е.А., Годовалов А.П., Мелехин С.В. Некоторые особенности фармакодинамики циклофосфана у экспериментальных животных. *Мед. иммунология.* 13(4–5): 323. 2011. [Loseva L.F., Donenko F.V., Lebedinskaya O.V., Akhmatov E.A., Lebedinskaya E.A., Godovalov A.P., Melekhin S.V. Some features of the pharmacodynamics of cyclophosphamide in experimental animals. *Med. Immunol.* 13(4–5): 323. 2011. (In Russ.)].
18. Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 69(1): 4–9. 2014.
19. Ward P.A. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1203: 53–59. 2010.
20. Van Deursen J.M. The role of senescent cells in ageing. *Nature.* 509: 439–446. 2014.
21. Kadota T., Fujita Yu., Yoshioka Y., Araya J., Kuwano K., Ochiya T. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17(11): 1801. 2016.
22. Borodkina A.V., Deryabin P.I., Giukova A.A., Nikolsky N.N. “Sochial life” of senescent cells: what is SASP and why study it? *Acta Naturae.* 10(1–36): 4–14. 2018.



23. Kumar M., Seeger W., Voswinkel R. Senescence-associated secretory phenotype and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51: 323–333. 2014.
24. Richmond B.W., Brucker R.M., Han W., Du R.H., Zhang Y., Cheng D.S., Gleaves L., Abdolrasulnia R., Polosuchina D., Clark P.E., Bordenstein S.R., Blackwell T.S., Polosuchin V.V. Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency. *Nat. Commun.* 7: 11240. 2016.
25. Лямина С.В., Мальшев И.Ю. Сурфактантный белок D в норме и при заболеваниях легких. *Рос. мед. журн.* 1: 50–55. 2012. [Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. Surfactant protein D is normal and in lung diseases. *Russ. Med. J.* 1: 50–55. 2012. (In Russ.)].
26. Zhou D.J., Chen Y., Zhang X.J., Ma C., Qiu J., Zhou J.H. Effects of oleic acid on SP-B expression and release in A549 cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19(18): 3438–3443. 2015.
27. Hemming J.M., Hughes B.R., Rennie A.R., Tomas S., Campbell R.A., Hughes A.V., Arnold T., Botchway S.W., Thompson K.C. Environmental pollutant ozone causes damage to lung surfactant protein B (SP-B). *Biochemistry.* 54(33): 5185–5197. 2015.

### Effect of Immunosuppression on the Bronchoalveolar Lavage Effectors of Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Modeling in Rats

O. N. Titova<sup>a</sup>, N. A. Kuzubova<sup>a</sup>, E. S. Lebedeva<sup>a, \*</sup>, T. N. Preobrazhenskaya<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>Scientific Research Institute of Pulmonology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: osmelena@mail.ru

**Abstract**—The model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced in rats by 60-day exposure to nitrogen dioxide was used to assess the effect of immunosuppression on the nature and rate of structural and functional disorders formation in the lungs. In the conditions of immunosuppression induced by cyclophosphamide, an earlier activation of the inflammatory process in the lungs was noted: (i) the influx of neutrophils was increased, (ii) the blood content of highly pathogenic immune complexes of average molecular weight increased, (iii) the content of proinflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid increased. In contrast to the control group, signs of the respiratory epithelium damage and the lung tissue restructuring with the manifestation of characteristic features of the COPD model (emphysema, sclerosis, and fibrosis) were detected after 30 (not 60) days from the beginning of nitrogen dioxide exposure. The results of the study suggest that when exposed to aggressive aerogenic substances that damage the respiratory epithelium, the initial immune dysfunction can contribute to the formation of a pro-inflammatory environment and the phenotype of premature aging of the lungs, predisposing to the development of chronic obstructive pulmonary pathology.

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease, immunosuppression, cyclophosphamide, nitrogen dioxide, inflammation, proinflammatory cytokines

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Титова О.Н., Кузубова Н.А., Лебедева Е.С., Преображенская Т.Н. Влияние иммуносупрессии на эффекторы воспаления в бронхоальвеолярном смыве при моделировании хронической обструктивной болезни легких у крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(6): 771–779.

DOI: 10.1134/S0869813919060086

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Titova O.N., Kuzubova N.A., Lebedeva E.S., Preobrazhenskaya T.N. Effect of Immunosuppression on the Bronchoalveolar Lavage Effectors of Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Modeling in Rats. *Russian Journal of Physiology.* 105(6): 771–779.

DOI: 10.1134/S0869813919060086