

Воспалительный ответ культивируемых макрофагов пациентов с нелеченной системной склеродермией

Е.В. Герасимова¹, А.И. Богатырева¹, Т.В. Кириченко², Т.В. Попкова¹, Р.У. Шаяхметова¹, Л.П. Ананьева¹, Ю.В. Маркина², А.М. Маркин², А.Н. Орехов³

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» 115522, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 34А

²ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» 119991, Российская Федерация, Москва, Абрикосовский пер., 2
³ФГАУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики» 117418, Российская Федерация, Москва, Профсоюзная ул., 33, корп. 4

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology 115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye Highway, 34A
²Petrovsky National Research Centre of Surgery 119991, Russian Federation, Moscow, Abrikosovskiy lane, 2
³National Research University Higher School of Economics 117418, Russian Federation, Moscow, Profsoyuznaya str., 33, корпус 4

Контакты: Герасимова Елена Владимировна, gerasimovaev@list.ru
Contacts: Elena Gerasimova, gerasimovaev@list.ru

Поступила 23.10.2025
Принята 06.03.2025

Введение. Хроническое воспаление является одним из основных факторов прогрессирования системной склеродермии (ССД). Макрофаги, активированные по провоспалительному пути, могут рассматриваться как основные клетки, поддерживающие хроническое системное воспаление.

Цель исследования – оценка воспалительного ответа и резистентности макрофагов у пациентов с системной склеродермией для определения наиболее значимых медиаторов воспаления в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы. В исследование включено 34 пациента с нелеченной ССД и 17 человек контрольной группы. Макрофаги получали путем культивирования моноцитов периферической крови. Ответ макрофагов анализировался по отклонениям показателей базальной, стимулированной липополисахаридами (ЛПС) и рестимулированной секреции по фактору некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкину (ИЛ) 1 β , CCL2 (C-C motif ligand 2) и ИЛ-8 у больных ССД по сравнению с контролем. Оценка уровня базальной и ЛПС-стимулированной секреции проводилась на 1-е сутки. Вторую стимуляцию ЛПС проводили на 7-е сутки для оценки ответа клетки на повторную стимуляцию (рестимулированная секреция) для характеристики резистентности иммунного ответа макрофагов. Резистентность (толерантность) клеток рассчитывалась как отношение секреции при повторной стимуляции к ЛПС-стимулированной секреции. Концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β , CCL2 и ИЛ-8 в культуральной жидкости определялись с использованием иммуноферментного анализа.

Результаты. Базальная и рестимулированная секреция всех исследуемых цитокинов макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови, была статистически значимо выше в группе ССД по сравнению с контрольной группой; ЛПС-стимулированная секреция в группе ССД была выше только по ИЛ-1 β . Нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов по CCL2 выявлено у 50% пациентов с нелеченной ССД.

Заключение. Результаты исследования демонстрируют провоспалительный ответ макрофагов с повышенными уровнями базальной и рестимулированной секреции ФНО- α , ИЛ-1 β , CCL2 и ИЛ-8, а также нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов у нелеченных пациентов с ССД по CCL2. Полученные данные свидетельствуют об активном участии CCL2 в развитии хронического воспаления у больных ССД, что может рассматриваться как основание для разработки новых терапевтических подходов при ССД.

Ключевые слова: системная склеродермия, макрофаги, воспаление, цитокины, иммунная толерантность

Для цитирования: Герасимова ЕВ, Богатырева АИ, Кириченко ТВ, Попкова ТВ, Шаяхметова РУ, Ананьева ЛП, Маркина ЮВ, Маркин АМ, Орехов АН. Воспалительный ответ культивируемых макрофагов пациентов с нелеченной системной склеродермией. *Научно-практическая ревматология*. 2025;63(2):176–182.

INFLAMMATORY RESPONSE OF CULTURED MACROPHAGES IN TREATMENT-NAIVE PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Elena V. Gerasimova¹, Anastasia I. Bogatyreva¹, Tatiana V. Kirichenko², Tatiana V. Popkova¹, Rushana U. Shayakhmetova¹, Lidia P. Ananyeva¹, Yuliya V. Markina², Alexander M. Markin², Alexander N. Orekhov³

Background. Chronic inflammation is one of the main factors in the progression of systemic sclerosis (SSc). Macrophages activated via a proinflammatory pathway can be considered as major participants in the maintaining of system chronic low-grade inflammation.

The aim of this study was to evaluate the inflammatory response and of macrophages in patients with systemic sclerosis to reveal the most significant inflammatory mediators in pathogenesis of this disease.

Materials and methods. The study included 34 treatment-naive SSc patients and 17 controls.

Macrophages were obtained by culturing peripheral blood monocytes. The macrophage response was analyzed by deviations in the parameters of basal, lipopolysaccharide (LPS) stimulated, and restimulated secretion of the tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL) 1 β , C-C motif ligand 2 (CCL2), and IL-8 by cultured macrophages in SSc patients compared to the control group. The levels of basal and LPS-stimulated secretion were assessed on day 1. The second LPS stimulation was performed on day 7 to assess the cell response to repeated stimulation (restimulated secretion) after the first stimulation to characterize the resistance of the macrophage immune response. Cell resistance (tolerance) was calculated as the ratio of secretion during repeated stimulation to LPS-stimulated secretion. Concentrations of TNF- α , IL-1 β , CCL2, and IL-8 cytokines in the culture fluid were determined out using an enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Basal and restimulated secretion of all studied cytokines was significantly higher in the SSc group compared to the control group; LPS-stimulated secretion was statistically significantly higher in the SSc group only for IL-1 β .

Impaired resistance of the immune tolerance of macrophages to CCL2 was detected in 50% of treatment-naive SSc patients. **Conclusions.** The results of the study demonstrate a pro-inflammatory response of macrophages with increased levels of basal and restimulated secretion of TNF- α , IL-1 β , CCL2 and IL-8, as well as impaired tolerance of the immune response of macrophages in treatment-naive SSc patients in relation to the secretion of CCL2. These data indicate the active participation of CCL2 in the development of chronic inflammation in SSc that can be considered as a target for the development of new therapeutic approaches for SSc.

Key words: systemic sclerosis, macrophages, inflammation, cytokines, immune tolerance

For citation: Gerasimova EV, Bogatyreva AI, Kirichenko TV, Popkova TV, Shayakhmetova RU, Ananyeva LP, Markina YuV, Markin AM, Orekhov AN. Inflammatory response of cultured macrophages in treatment-naïve patients with systemic sclerosis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice*. 2025;63(2):176–182 (In Russ.).
doi: 10.47360/1995-4484-2025-176-182

Введение

Системная склеродермия (ССД) или системный склероз — это аутоиммунное заболевание соединительной ткани, характеризующееся генерализованным фиброзом кожи и внутренних органов, воспалением, нарушением микроциркуляции [1]. Существующие методы лечения пока не позволяют в достаточной мере контролировать прогрессирование болезни, поэтому остро стоит вопрос о разработке новых терапевтических подходов [2–4]. Заболевание отличается высокой гетерогенностью больных, различия в формах, тяжести поражения кожи и внутренних органов [1]. Гетерогенность клинических проявлений ССД влияет на идентификацию и классификацию заболевания, а также на подходы к терапии. Однако механизмы, лежащие в основе клинической гетерогенности, на сегодняшний день изучены недостаточно.

По современным представлениям, модель прогрессирования ССД включает в себя дисфункцию иммунной системы, васкулопатию и фиброз [5]. Основными дисфункциональными типами клеток являются иммунные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты, которые напрямую или косвенно взаимодействуют, что приводит к воспалению, нарушению васкуляризации, гиперактивации миофибробластов и необратимому фиброзу [6].

В последние годы получены сведения о важном вкладе клеток врожденного иммунитета при ССД [5, 7]. При хронизации воспалительного процесса происходит аномальная активация макрофагов и нарушаются функции иммунной системы, направленные на разрешение воспалительной реакции. Активированные макрофаги участвуют в выработке большого количества воспалительных медиаторов, включая цитокины, хемокины, матриксные металлопротеиназы (ММП), которые приводят к активации фибробластов и напрямую стимулируют другие профибротические и хемоаттрактивные факторы и межклеточные молекулы адгезии, что способствует развитию фиброза тканей и аномальной морфологии сосудов [5, 8]. Известно, что чрезмерная стимуляция моноцитов и макрофагов приводит к избыточной продукции, в первую очередь, фактора некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкина (ИЛ) 1β , ИЛ-6 и хемокина CCL2 (C-C motif ligand 2) или MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) [5].

Под действием воспалительных агентов (цитокины, катехоламины, факторы роста) периферические моноциты мигрируют в ткани и дифференцируются в макрофаги [9]. Содержание CD14⁺-моноцитов и макрофагов в пораженной коже пациентов с ССД в несколько раз превышает число других воспалительных лейкоцитов [10].

По современным представлениям, не меньшее значение имеют механизмы иммунного контроля за воспалением, в процессах разрешения которого особая роль отводится клеткам врожденного иммунитета [11].

Иммунная резистентность, также известная как иммунная толерантность, относится к состоянию невосприимчивости иммунной системы к веществам или тканям, которые вызывают иммунный ответ. Она возникает

в результате предварительного воздействия определенного антигена и меньшей реакции при повторном контакте с ним и контрастирует с обычной ролью иммунной системы в устранении чужеродных антигенов [12–14]. Иммунная резистентность клеток характеризуется эпигенетическим перепрограммированием врожденного иммунитета, что объясняет долгосрочные защитные эффекты от гиперстимуляции клеток. Предполагается, что нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов может быть важным патогенетическим фактором в развитии хронического воспаления, в том числе при ССД [15].

Цель исследования — изучить воспалительный ответ макрофагов по величине базальной, стимулированной липополисахаридом (ЛПС) и рестимулированной секреции фактора некроза опухоли α , интерлейкина 1β , хемокина CCL2 и интерлейкина 8 и оценить иммунную резистентность макрофагов при системной склеродермии для выявления наиболее значимых медиаторов воспаления в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В исследование был включен 51 участник: 34 пациента с нелеченной ССД и 17 лиц без иммуновоспалительных ревматических заболеваний и других аутоиммунных болезней, которые были сопоставимы по полу и возрасту.

Критерии включения в исследование: мужчины и женщины в возрасте от 20 до 65 лет с диагнозом ССД, не получающие терапию глюкокортикоидами, базисными противовоспалительными и генно-инженерными биологическими препаратами. Критерии исключения: наличие сахарного диабета, декомпенсированной почечной или печеночной недостаточности, хронической сердечной недостаточности III–IV класса по NYHA (New York Heart Association). Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренной версией 2013 г. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой 10.02.2022. Все участники предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Клиническая и лабораторная характеристика пациентов с ССД и контрольной группы представлена в таблице 1.

Для получения CD14⁺-моноцитов была использована цельная кровь участников исследования в количестве 30 мл. Выделение первичной культуры моноцитов проводили по стандартной методике получения лейкоцитарной фракции в градиенте фикола (ПанЭко, Россия) с последующей магнитной сепарацией CD14⁺-клеток на колонках (Miltenyi Biotec Inc., США) с помощью парамагнитных наночастиц (Miltenyi Biotec Inc., США). После выделения CD14⁺-моноциты культивировали в количестве 500 000 клеток на лунку в среде X-VIVO 10 с L-глутамином, гентамицином и феноловым красным (Lonza, Германия) в двух лунках культурального планшета. Для дифференцировки моноцитов в макрофаги использовали макрофагальный колоние-стимулирующий фактор в концентрации 50 нг/мл.

Таблица 1. Характеристика пациентов с системной склеродермией и контрольной группы

Показатель	ССД (n=34)	Контроль (n=17)
Возраст (лет), Ме [25-й; 75-й перцентили]	50 [38; 62]	48 [36; 66]
Пол: женский/мужской (%)	85/15	82/18
Длительность первого не-Рейно-синдрома (годы), Ме [25-й; 75-й перцентили]	6,9 [0,9; 12,4]	–
Длительность синдрома Рейно (годы), Ме [25-й; 75-й перцентили]	9,0 [1,5; 15,9]	–
Форма:		–
лимитированная, %	85	–
диффузная, %	15	–
Индекс активности, Ме [25-й; 75-й перцентили]	1,8 [0,8; 2,5]	–
Кожный счет по mRSS, Ме [25-й; 75-й перцентили]	8 [3; 10]	–
Проявления ССД, n (%)		
склередема	17 (50)	–
склеродактилия	12 (35)	–
дигитальные язвочки	13 (38)	–
дигитальные рубчики	5 (15)	–
телеангиэктазии	16 (47)	–
синдром рейно	33 (97)	–
капилляроскопические изменения	30 (88)	–
СДЛА \geq 40 мм рт. ст. по данным ЭхоКГ	4 (12)	–
ИПЛ по данным МСКТ органов грудной клетки	7 (21)	–
Позитивность по аутоантителам, n (%):		
АНФ-Нер2	33 (97)	–
антитела к топоизомеразе 1	11 (32)	–
АЦА	17 (50)	–
антитела к РНП	3 (9)	–
СРБ (мг/л), Ме [25-й; 75-й перцентили]	4,8 [4,1; 7,9]*	2,0 [0,8; 2,8]
СОЭ (мм/ч), Ме [25-й; 75-й перцентили]	18 [8; 28]*	6 [2; 15]

Примечание: ССД – системная склеродермия; mRSS – модифицированная оценка кожи по шкале Роднана (*modified Rodnan skin score*); СДЛА – систолическое давление в легочной артерии; ЭхоКГ – эхокардиография; ИПЛ – интерстициальное поражение легких; МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография; АНФ-Нер2 – антинуклеарный фактор на клеточной линии Нер-2; АЦА – антицентромерные антитела; РНП – рибонуклеопротеин; СРБ – С-реактивный белок; СОЭ – скорость оседания эритроцитов; * – $p < 0,05$

Для модуляции воспалительного процесса в клеточных экспериментальных моделях в качестве патологического стимула использовался ЛПС [16]. Для стимулирования провоспалительного ответа макрофагов во вторую лунку был добавлен ЛПС *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл. После 24 часов инкубации определяли базальную и ЛПС-стимулированную секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами. Для анализа клеточного ответа на повторную воспалительную стимуляцию клетки культивировали в среде без ЛПС в течение 5 суток, после чего меняли среду и во вторую лунку повторно добавляли ЛПС на 24 часа. На 7-е сутки определяли рестимулированную секрецию цитокинов. Вторую стимуляцию ЛПС проводили для оценки ответа клетки на повторную стимуляцию для характеристики резистентности иммунного ответа макрофагов.

Исследование секреции провоспалительных цитокинов

Для определения концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β , ССЛ2 и ИЛ-8 в культуральной жидкости использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА): Human TNF-alpha/TNFSF1A DuoSet ELISA, Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, Human CCL2/

MCP-1 DuoSet ELISA, Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (R&D Systems Inc., США).

Ответ макрофагов анализировался по отклонениям показателей базальной, ЛПС-стимулированной и рестимулированной секреции макрофагов у больных ССД по сравнению с контрольной группой, а также по нарушению резистентности (толерантности) клеток, рассчитанной как отношение секреции при повторной стимуляции к ЛПС-стимулированной секреции.

Культивирование моноцитов и определение секреции провоспалительных цитокинов культивируемыми моноцитами крови участников исследования производилось в лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (заведующий лабораторией – д.м.н. А.Ю. Постнов).

Статистический анализ

Статистический анализ данных, полученных в ходе исследования, был проведен с использованием языка программирования R для статистических вычислений.

Для статистической обработки были использованы следующие библиотеки: «outliers», «readxl», «psych», «ggplot2», «FSA», «car», «ggstatsplot»; команды: «ggbetweenstats», «kruskal.test», «pairwise.wilcox.test», «dunnTest». Данные представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей.

Результаты

Базальная секреция всех исследуемых цитокинов в группе ССД была статистически значимо выше, чем в контроле, в то время как различия по уровню ЛПС-стимулированной секреции были статистически значимы только для ИЛ-1 β (табл. 2). При сравнении рестимулированной секреции также были обнаружены статистически значимые различия для всех исследуемых цитокинов.

Выявлена прямая корреляция модифицированного кожного счета Роднана (mRSS, modified Rodnan skin score) с секрецией провоспалительных цитокинов: базальной и рестимулированной по ИЛ-1 β ($R=0,40$ и $R=0,51$), ЛПС-стимулированной и рестимулированной по ИЛ-8 ($R=0,68$ и $R=0,55$) ($p<0,05$ во всех случаях).

Соотношение рестимулированной и ЛПС-стимулированной секреции как резистентность макрофагов представлено в таблице 3.

У больных ССД резистентность по ИЛ-1 β , CCL2 и ИЛ-8 была выше, чем у здоровых доноров. Нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов по CCL2 на-

блюдалось у 17 (50%) пациентов с ССД. Частота нарушений резистентности по остальным цитокинам при ССД и в контроле не различалась.

При длительности ССД более 5 лет ($n=18$) резистентность макрофагов по CCL2 нарушалась в 2 раза чаще (69% против 33%; $p=0,08$) и была несколько выше (медиана 0,41 [0,21; 0,82] против 0,35 [0,22; 0,58]; $p=0,05$), чем при меньшей длительности болезни ($n=16$). По уровню базальной, ЛПС-стимулированной и рестимулированной секреции цитокинов эти группы не различались.

Зависимости резистентности макрофагов от формы, активности и других клинико-лабораторных проявлений ССД не выявлено.

Обсуждение

Для определения закономерностей воспалительного ответа макрофагов нами была подобрана сравнительно однородная группа нелеченных больных ССД. У наших пациентов отмечались относительно низкая активность заболевания, невысокий кожный счет с минимальным поражением кожи кистей и высокая частота позитивности по антицентромерным антителам (АЦА), что может свидетельствовать об относительно хорошем прогнозе течения ССД [17, 18]. Известно, что у пациентов, экспрессирующих АЦА, определяется более высокий риск развития легочной артериальной гипертензии (ЛАГ) и низкий – интерстициального поражения легких (ИПЛ) на ранней стадии

Таблица 2. Секреция провоспалительных цитокинов в макрофагах, пг/мл

Секреция	ССД (n=34)	Контроль (n=17)	p
ФНО- α			
Базальная секреция	121 [94; 169]	62 [51; 78]	<0,001
ЛПС-стимулированная секреция	4457 [4133; 5679]	2911 [2481; 4554]	–
Рестимулированная секреция	97 [86; 127]	83 [58; 91]	<0,05
ИЛ-1 β			
Базальная секреция	249 [152; 280]	52 [45; 87]	<0,001
ЛПС-стимулированная секреция	1724 [1139; 2210]	760 [640; 1176]	<0,05
Рестимулированная секреция	231 [195; 240]	84 [69; 100]	<0,001
CCL2			
Базальная секреция	4956 [2562; 10945]	1686 [1397; 2506]	<0,001
ЛПС-стимулированная секреция	22566 [9102; 49532]	42798 [25204; 54503]	–
Рестимулированная секреция	11159 [5457; 17226]	2680 [1820; 3909]	<0,01
ИЛ-8			
Базальная секреция	32517 [17098; 54013]	8513 [6723; 18103]	<0,01
ЛПС-стимулированная секреция	568674 [276434; 602448]	307603 [141988; 348669]	–
Рестимулированная секреция	28773 [26642; 124327]	20281 [13793; 28190]	<0,01

Примечание: ССД – системная склеродермия; ФНО- α – фактор некроза опухоли- α ; ИЛ – интерлейкин; CCL2 – лиганд 2 C-C мотива (C-C motif ligand 2); данные представлены в виде Me [25-й; 75-й перцентили]

Таблица 3. Резистентность макрофагов у больных системной склеродермией и у лиц контрольной группы

Резистентность	ССД (n=34)	Контроль (n=17)	p
ФНО- α	0,02 [0,01; 0,05]	0,03 [0,02; 0,09]	0,3
ИЛ-1 β	0,12 [0,10; 0,18]	0,09 [0,07; 0,13]	0,01
CCL2	0,36 [0,11; 0,72]	0,10 [0,06; 0,24]	<0,01
ИЛ-8	0,15 [0,08; 0,21]	0,09 [0,06; 0,13]	0,02

Примечание: ССД – системная склеродермия; ФНО- α – фактор некроза опухоли- α ; ИЛ – интерлейкин; CCL2 – лиганд 2 C-C мотива (C-C motif ligand 2)

заболевания [17]. Кроме того, у таких пациентов чаще наблюдаются ограниченное поражение кожи и более медленное развитие повреждения капилляров ногтевого ложа, чем у больных ССД с другими ССД-специфическими антителами. Но, несмотря на «сосудистый субтип» ССД с преобладанием дигитальных нарушений, у наших больных наблюдался и выраженный воспалительный компонент процесса. Об этом свидетельствует как повышение стандартных острофазовых показателей (С-реактивного белка (СРБ) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ)), так и более высокий уровень секреции провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , хемокинов CCL2 и ИЛ-8 макрофагами пациентов с ССД по сравнению с контрольной группой. Но если СОЭ и уровень СРБ не выходили за рамки референсных значений, то базальная секреция воспалительных цитокинов макрофагами в 2–5 раз превышала соответствующие значения у здоровых доноров. Немаловажным представляется факт отсутствия зависимости базальной и ЛПС-стимулированной секреции от длительности ССД, что может отражать высокий уровень воспаления на всех стадиях заболевания.

Воспалительные процессы являются основополагающими при формировании всех трех фенотипических проявлений ССД: 1) сосудистых нарушений; 2) аутоиммунных/иммунных атак; 3) фиброза [5]. Расшифровка единичных компонентов воспаления, которые одновременно действуют в нескольких направлениях, остается важной целью для понимания патофизиологии ССД.

При ССД циркулирующие моноциты и макрофаги под влиянием цитокинов 2-го типа (ИЛ-4, ИЛ-13), по-видимому, экспрессируют преимущественно CD163 и CD204 и способствуют фиброгенезу за счет увеличения продукции трансформирующего фактора роста β (ТФР- β). Они также участвуют в выработке большого количества других воспалительных медиаторов, включая цитокины, ММП и их ингибиторы, состав и роль которых могут зависеть от локализации и длительности воспалительного процесса. Чрезмерная стимуляция макрофагов и, как следствие, избыточная продукция ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-4, ТФР- β , тромбоцитарного фактора роста напрямую стимулируют профибротические факторы, хемоаттрактивные и межклеточные молекулы адгезии [6].

Известно, что при ССД ФНО- α представляет собой один из основных цитокинов, который способен активировать эндотелиальные клетки и привлекать иммунные клетки, секретирующие провоспалительные цитокины [19]. В нашем исследовании наблюдалась значительная связь между mRSS и уровнями секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-8 макрофагами. Роль ИЛ-1 β состоит в активации миофибробластов, приводящей к усилению фиброзного состояния при ССД. Было показано, что ИЛ-1 β способен стимулировать переход эндотелиальных клеток в мезенхимальные, что является еще одним патологическим механизмом развития фиброза [20, 21].

Помимо этого, участие макрофагов в воспалительных и фиброзных процессах при ССД осуществляется за счет сверхпродукции ИЛ-6, ИЛ-8, CCL2, CXCL10 (C-X-C motif chemokine ligand 10) и факторов роста [22, 23]. ИЛ-8 также обладает способностью привлекать нейтрофилы и иммунные клетки к очагу воспаления, стимулировать развитие ангиогенеза, что приводит к повреждению сосудов и активации фибробластов [24]. Действие CCL2 связано с активацией синтеза внеклеточного матрикса в фибробластах,

а также со стимуляцией миграции иммунных клеток в пораженные участки кожи [25, 26].

Важным механизмом иммунного контроля за воспалением является способность клеток врожденного иммунитета развивать резистентность иммунного ответа в отношении повторных стимулов [11]. Согласно результатам исследований M.G. Netea и соавт. [27], в норме клетки врожденного иммунитета характеризуются иммунологической памятью, то есть после воздействия воспалительного стимула клетки вырабатывают толерантность к данному патогену и при повторной стимуляции секретируют медиаторы воспаления в значительно меньшем количестве, чем при первичной стимуляции. В нашем исследовании показано, что уровни повторно стимулированной секреции цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-8 были статистически значимо ниже первично стимулированной секреции в группе ССД и контроля, что характеризует толерантность иммунного ответа макрофагов в отношении данных цитокинов. Уровень рестимулированной секреции CCL2 в среднем был статистически значимо ниже первично стимулированной секреции в обеих группах, однако у половины пациентов с ССД отмечалось нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов по CCL2, то есть повторно стимулированная секреция была сравнима или выше первично стимулированной секреции. При этом в контрольной группе у всех участников был резистентный иммунный ответ макрофагов в отношении секреции CCL2.

Ранее в исследованиях, направленных на изучение иммунной резистентности клеток врожденного иммунитета при ССД, было показано, что нарушение тренированного иммунитета может быть одним из механизмов развития фиброза [28]. В недавнем исследовании на первичных клеточных культурах была обнаружена повышенная базальная секреция CCL2 культивируемыми мононуклеарными клетками периферической крови, а также фибробластами пациентов с ССД [29]. На экспериментальной мышинной модели ССД стимуляция иммунного ответа макрофагов БЦЖ и ЛПС приводила к усилению секреции MCP-1, ИЛ-6 и ФНО- α , что явилось подтверждением нарушения иммунологической резистентности макрофагов [15]. В клинических исследованиях показано, что сывороточный уровень CCL2 значительно повышен у пациентов с ССД [30] и ассоциирован с биомаркерами фиброза кожи и легких [31]. Высокий уровень CCL2 секретируется при воспалительных реакциях и является мощным фактором хемотаксиса моноцитов, Т-клеток и дендритных клеток к образовавшимся очагам поражения [32]. По результатам нашего исследования резистентность иммунного ответа макрофагов по CCL2 в большей степени нарушалась при увеличении длительности ССД, когда уже сформировались фиброз тканей и аномальная морфология сосудов.

На 3D-модели кожи человека культивирование первичных дермальных фибробластов в присутствии CD14⁺-моноцитов приводило к увеличению числа фибробластных конструкций Sis-индуцируемых элементов (SIE, Sis-inducible element) и ядерного фактора «каппа-би» (NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [33]. Медиаторы воспаления моноцитов (ИЛ-6, ИЛ-1 и S100A8/9) способствовали сокращению числа миофибробластов. Это исследование подтвердило участие моноцитов и внутриклеточных сигнальных путей SIE и NF- κ B в сокращении количества миофибробластов при фиброзе кожи у больных ССД.

Значительный прогресс в нашем понимании, основанный на все более точной идентификации типов клеток, а также межклеточных молекулярных сигналов, участвующих в патогенезе ССД, имеет значение не только для фундаментальных исследований, но и для клинической практики, способствуя оптимизации наблюдения за пациентами и своевременной диагностике ранних форм ССД.

В частности в настоящее время не существует инструментов, позволяющих с большой долей вероятности прогнозировать развитие ССД у лиц с первичным синдромом Рейно. Было показано, что капилляроскопия ногтевого ложа полезна для ранней диагностики системных заболеваний соединительной ткани [34]; однако, по данным метаанализа, прогностическая ценность этого метода не превышала 50% [35], а обнаружение «склеродермического» паттерна имело чувствительность 71% [36].

Выявление так называемых «промежуточных патенофенотипов» для учета динамических процессов, лежащих в основе гетерогенности ССД, лучшего понимания механизмов, участвующих в патогенезе ССД на клеточном и тканевом уровнях, является крайне важным, поскольку более ранняя диагностика и назначение терапии могут способствовать снижению тяжести заболевания и уменьшению числа его осложнений.

Заключение

Таким образом, результаты настоящего исследования демонстрируют воспалительную активацию макрофагов по цитокинам ФНО- α , ИЛ-1 β и хемокинам CCL2 и ИЛ-8 у пациентов с ССД, а также нарушение резистентности иммунного ответа макрофагов в отношении секреции CCL2. Полученные данные могут свидетельствовать об активном участии CCL2 в прогрессировании хронического воспаления у пациентов с ССД, что позволяет рассматривать данный хемокин в качестве потенциальной мишени при разработке новых терапевтических стратегий при ССД.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда № 24-15-00227.

Прозрачность исследования

Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Volkman ER, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2023;401(10373):304–318. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01692-0
- Moore DF, Steen VD. Racial disparities in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2020;46(4):705–712. doi: 10.1016/j.rdc.2020.07.009
- Coffey CM, Radwan YA, Sandhu AS, Crowson CS, Bauer PR, Matteson EL, et al. Epidemiology and trends in survival of systemic sclerosis in Olmsted county (1980–2018): A population-based study. *J Scleroderma Relat Disord*. 2021;6(3):264–270. doi: 10.1177/23971983211026853
- Li JX. Secular trends in systemic sclerosis mortality in the United States from 1981 to 2020. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(22):15088. doi: 10.3390/ijerph192215088
- Bazsó A, Szodoray P, Shoenfeld Y, Kiss E. Biomarkers reflecting the pathogenesis, clinical manifestations, and guide therapeutic approach in systemic sclerosis: A narrative review. *Clin Rheumatol*. 2024;43:3055–3072. doi: 10.1007/s10067-024-07123-y
- Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current concepts on the pathogenesis of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023;64(3):262–283. doi: 10.1007/s12016-021-08889-8
- Trombetta AC, Soldano S, Contini P, Tomatis V, Ruaro B, Paolino S, et al. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir Res*. 2018;19(1):186. doi: 10.1186/s12931-018-0891-z
- Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: Current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(7):753–764. doi: 10.1080/1744666X.2019.1614915
- Peng Y, Zhou M, Yang H, Qu R, Qiu Y, Hao J, et al. Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*. 2023;2023:8821610. doi: 10.1155/2023/8821610
- Yang S, Zhao M, Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2023;14:1080310. doi: 10.3389/fimmu.2023.1080310
- Bekkering S, Blok BA, Joosten LA, Riksen NP, van Crevel R, Netea MG. In vitro experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(12):926–933. doi: 10.1128/CVI.00349-16
- Simpson E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: A commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) 'Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance.' *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1666):20140382. doi: 10.1098/RSTB.2014.0382
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance' of foreign cells. *Nature*. 1953;172:603–606.
- Murphy K. Autoimmunity and transplantation. In: Murphy K, Weaver C (eds). *Janeway's Immunobiology*. 2015. URL: <https://www.numerade.com/books/chapter/autoimmunity-and-transplantation/> (Accessed: 1st November 2024).
- Jeljeli M, Riccio LGC, Doridot L, Chêne C, Nicco C, Chouzenoux S, et al. Trained immunity modulates inflammation-induced fibrosis. *Nat Commun*. 2019;10(1):5670. doi: 10.1038/s41467-019-13636-x
- Калашникова СА, ЛВ. Использование бактериального липополисахарида для моделирования патологических процессов в медико-биологических исследованиях (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. 2017;24(2):209–219. [Kalashnikova SA, Polyakova LV. The use of bacterial lipopolysaccharide for pathological processes modeling in biomedical research (literature review). *Journal of New Medical Technologies*. 2017;24(2):209–219 (In Russ.)]. doi: 10.12737/article_5947d50a4ddf68.91843258
- Perosa F, Prete M, Di Lernia G, Ostuni C, Favoino E, Valentini G. Anti-centromere protein A antibodies in systemic sclerosis: Significance and origin. *Autoimmun Rev*. 2016;15(1):102–109. doi: 10.1016/j.AUTREV.2015.10.001
- Tiniakou E, Crawford J, Darrah E. Insights into origins and specificities of autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2021;33(6):486–494. doi: 10.1097/BOR.0000000000000834
- Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Puppo F. Potential use of TNF- α inhibitors in systemic sclerosis. *Immunotherapy*. 2014;6(3):283–289. doi: 10.2217/imt.13.173
- Xu D, Mu R, Wei X. The roles of IL-1 family cytokines in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:2025. doi: 10.3389/fimmu.2019.02025
- Lin C, Jiang Z, Cao L, Zou H, Zhu X. Role of NLRP3 inflammasome in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2022;24(1):196. doi: 10.1186/s13075-022-02889-5

22. Carvalho T, Horta S, van Roon JAG, Santiago M, Salvador MJ, Trindade H, et al. Increased frequencies of circulating CXCL10-, CXCL8- and CCL4-producing monocytes and Siglec-3-expressing myeloid dendritic cells in systemic sclerosis patients. *Inflamm Res*. 2018;67(2):169-177. doi: 10.1007/s00011-017-1106-7
23. Rudnik M, Hukara A, Kocherova I, Jordan S, Schniering J, Milleret V, et al. Elevated fibronectin levels in profibrotic CD14⁺ monocytes and CD14⁺ macrophages in systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2021;12:642891. doi: 10.3389/fimmu.2021.642891
24. Codullo V, Baldwin HM, Singh MD, Fraser AR, Wilson C, Gil-mour A, et al. An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):1115-1121. doi: 10.1136/ard.2010.137349
25. Al-Adwi Y, Westra J, van Goor H, Burgess JK, Denton CP, Mulder DJ. Macrophages as determinants and regulators of fibrosis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2023;62(2):535-545. doi: 10.1093/rheumatology/keac410
26. Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O. Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(2):98-103. doi: 10.1093/rheumatology/ken401
27. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):355-361. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006
28. Badii M, Gaal O, Popp RA, Crişan TO, Joosten LAB. Trained immunity and inflammation in rheumatic diseases. *Joint Bone Spine*. 2022;89(4):105364. doi: 10.1016/j.jbspin.2022.105364
29. Bhandari R, Ball MS, Martyanov V, Popovich D, Schaafsma E, Han S, et al. Profibrotic activation of human macrophages in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(7):1160-1169. doi: 10.1002/art.41243
30. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari SM, Giuggioli D, Colacci M, et al. CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis – A longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(1):45-49. doi: 10.1093/rheumatology/kem313
31. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2011; 30(2): 231-237. doi: 10.1007/s10067-010-1610-4
32. Kania G, Rudnik M, Distler O. Involvement of the myeloid cell compartment in fibrogenesis and systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(5):288-302. doi: 10.1038/S41584-019-0212-Z
33. Zanin-Silva DC, Van Kooten N, Papadimitriou T, Dorst D, Walgreen B, Vitters E, et al. Monocytes drive myofibroblast contraction in a 3D skin model used to understand fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2024;83(1):1907-1908.
34. Meli M, Gitzelmann G, Koppensteiner R, Amann-Vesti BR. Predictive value of nailfold capillaroscopy in patients with Raynaud's phenomenon. *Clin Rheumatol*. 2006;25(2):153-158. doi: 10.1007/S10067-005-1146-1
35. Spencer-Green G. Outcomes in primary Raynaud phenomenon: A meta-analysis of the frequency, rates, and predictors of transition to secondary diseases. *Arch Intern Med*. 1998;158(6):595-600. doi: 10.1001/ARCHINTE.158.6.595
36. Bissell LA, Abignano G, Emery P, Del Galdo F, Buch MH. Absence of scleroderma pattern at nail fold capillaroscopy valuable in the exclusion of scleroderma in unselected patients with Raynaud's phenomenon. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):262-283. doi: 10.1186/s12891-016-1206-5

Герасимова Е.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5815-561X>
Богатырева А.И. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1188-1945>
Кириченко Т.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2899-9202>
Попкова Т.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5793-4689>
Шаяхметова Р.У. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4688-9637>
Ананьева Л.П. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3248-6426>
Маркина Ю.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3781-6340>
Маркин А.М. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6649-7924>
Орехов А.Н. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>